

APR 5 0 1998

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:) Docket No.: GILLESPIE=1
Matthew T. GILLESPIE) Art Unit: 1643
Serial No.: 09/030,061) Examiner:
Filed: February 25, 1998) April 24, 1998
For: OSTEOCLASTGENIC...) Washington, D.C.
)

REQUEST FOR PRIORITY

Honorable Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

In accordance with the provisions of 37 CFR 1.55 and the requirements of 35 USC 119, there is filed herewith a certified copy of:

Japanese Appl. No.: 9-055468 Filed: February 25, 1997.

It is respectfully requested that applicant be granted the benefit of the priority date of the foreign application.

Respectfully submitted,

BROWDY AND NEIMARK, P.L.L.C.
Attorneys for Applicant

By:


NORMAN J. LATKER
Reg. No. 19,963

Telephone No.: (202) 628-5197
Facsimile No.: (202) 737-3528
Enclosures
NJL:lt

APR 20 1998

DECLARATION

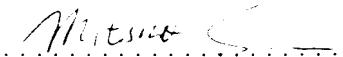
I, Mitsuo SUMA

a citizen of Japan

of 5-44, 5-chome, Kamiimaizumi, Ebina-shi, Kanagawa, Japan

do solemnly and sincerely declare that I have a competent knowledge of English and Japanese languages and that the following is a true and accurate translation of the attached certificate numbered HEI 10-3016074 and dated 20th March 1998.

16th April 1998



Mitsuo SUMA

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: 25th February, 1997

Application Number: Patent Application No. 055468/1997

Applicant(s): KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU
KENKYUJO

Dated this 20th day of March 1998

Commissioner,
Patent Office Hisamitsu ARAI

Certificate No. Hei 10-3016074

【Document】 Patent Application

【Our Ref.】 10053901

【Filing Date】 25th February 1997

【Address】 to the Commissioner of the Patent Office

【Int. Classification】 A 61 K 38/19 C 07 K 14/52 C 12 N 15/19

【Title of the Invention】 Osteoclastgenic inhibitory agent

【Number of Claims】 8

【Inventor】

 【Address】 Department of Medicine, the University of Melbourne and St. Vincent's Institute of Medical Research, 41 Victoria parade, Fitzroy 3065, the Commonwealth of Australia

 【Name】 Matthew Todd Gillespie

【Inventor】

 【Address】 Department of Medicine, the University of Melbourne and St. Vincent's Institute of Medical Research, 41 Victoria parade, Fitzroy 3065, the Commonwealth of Australia

 【Name】 Nicole Joy Horwood

【Inventor】

 【Address】 16-7, 3-chome, Akehara, Kashiwa-shi, Chiba, Japan

 【Name】 Nobuyuki Udagawa

【Inventor】

 【Address】 7-25, 2-chome, Gakunan-cho, Okayama-shi, Okayama, Japan

 【Name】 Masashi KURIMOTO

【Applicant】

 【ID Number】 000155908

 【Address】 2-3, 1-chome, Shimoishii, Okayama-shi, Okayama, Japan

 【Name】 KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO

 【Representative】 Ken HAYASHIBARA

【List of the Filing Documents】

【Document】	Specification	1 copy
【Document】	Drawings	1 copy
【Document】	Abstract	1 copy

[Document name] Specification

[Title of the Invention] Osteoclastgenic inhibitory agent

[Claims]

1. An osteoclastgenic inhibitory agent, which comprises an interleukin-18 or its functional equivalent.

2. The inhibitory agent of claim 1, wherein said interleukin-18 includes the amino acid sequences of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, and SEQ ID NO: 3 as partial amino acid sequences.

3. The inhibitory agent of claim 1 or 2, wherein said interleukin-18 includes the amino acid sequences of SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 5 as partial amino acid sequences.

4. The inhibitory agent of claim 1, 2 or 3, wherein said interleukin-18 includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6.

5. The inhibitory agent of any one of claims 1 to 4, wherein said interleukin-18 is human origin.

6. The inhibitory agent of claim 1, 2 or 3, wherein said interleukin-18 includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7.

7. The inhibitory agent of any one of claims 1 to 6, which is a therapeutic agent for osteoclast-related diseases.

8. The inhibitory agent of any one of claims 1 to 7, which further contains a protein, buffer, or saccharide as a stabilizer.

[Detailed Description of the Invention]

The present invention relates to an osteoclastgenic inhibitory agent comprising an interleukin-18 (hereinafter

abbreviated as "IL-18") or its functional equivalent.

[Prior Art]

Osteoblasts' bone formation and osteoclasts' bone resorption are well balanced in healthy living bodies, and this keeps the bone tissues in normal conditions while old bone tissues are being replaced with fresh ones without altering the original bone shape. The phenomenon plays an important role in keeping living bodies' homeostasis such as controlling of the blood calcium concentration within a desired range. Once the balance is lost, especially when the bone resorption level exceeds the bone formation level, bone-related diseases and other diseases may be induced. Therefore, elucidation of the whole mechanism of bone resorption in living bodies, particularly, elucidation of osteoclasts is greatly highlighted due to its scientific and clinical significance.

However, the mechanism of osteoclast formation has not yet been completely elucidated even though interleukin 1 as a promoter and interleukin 4 as an inhibitor were found. This is because, similarly as various phenomena in living bodies, osteoclast formation in living bodies is controlled by the close and complicated relationship between promoters and inhibitors. Based on these, it is greatly expected to establish an effective osteoclastgenic inhibitory agent from the viewpoint of scientific and clinical aspects.

[Object of the Invention]

In view of the foregoing, the object of the present invention is to provide a novel and effective osteoclastgenic inhibitory agent.

[Means to Attain the Object]

IL-18 is one of cytokines as communication transferring substances in immune systems. At the finding, IL-18 was described as an **interferon- γ -inducing factor** as reported by Haruki OKAMURA in Japanese Patent Kokai Nos. 27,189/96 and 193,098/96, and in *Nature*, Vol. 378, No. 6,552, pp. 88-91 (1995), and then called **IL-18** according to the proposal by Shimpei USHIO et al., in *The Journal of Immunology*, Vol. 156, pp. 4,274-4,279 (1996). IL-18 has property of inducing productions of interferon- γ (hereinafter abbreviated as "**IFN- γ** "), an important biologically active substance for immunocompetent cells, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (hereinafter abbreviated as "**GM-CSF**"), and has property of augmenting the cytotoxicity and inducing the formation of killer cells.

During studying the above object, the present inventors found that a particular gene, capable of inhibiting osteoclast formation from osteoclastic precursor cells *in vitro*, is specifically expressed in quantities in stroma cells derived from mouse myeloma. Their further detailed analysis revealed that the gene encodes IL-18 that includes SEQ ID NO: 7 as a core sequence. Based on these findings, the present inventors proceeded studying and found that IL-18 and functional equivalents thereof effectively inhibit osteoclast formation, and the inhibition is mainly due to the action of GM-CSF induced and produced by IL-18. The present invention was made based on the aforesaid original findings.

The present invention solves the above object by an

osteoclastgenic inhibitory agent comprising IL-18 or its functional equivalent as an effective ingredient.

[Preferred Embodiments of the Invention]

The present invention relates to an osteoclastgenic inhibitory agent comprising IL-18 or its functional equivalent as an effective ingredient. The wording "**IL-18**" as referred to in the invention includes polypeptides with the above property independently of their sources and origins. For example, the IL-18 used in the present invention includes, as internal partial amino acid sequences, the amino acid sequences of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, and SEQ ID NO: 3, as well as SEQ ID NO: 4 and SEQ ID NO: 5, and includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 7 as a whole. The wording "**functional equivalent(s)**" as referred to in the present invention includes (i) those wherein one or more amino acids in the amino acid sequence of IL-18 are replaced with different amino acids, (ii) those wherein one or more amino acids are added to the N- and/or C-termini of the amino acid sequence of IL-18, (iii) those wherein one or more amino acids are inserted into the internal sites of the amino acid sequence of IL-18, (iv) those wherein one or more amino acids in the N- and/or C-terminal regions of the amino acid sequence of IL-18 are deleted, and (v) those wherein one or more amino acids in the internal regions of the amino acid sequence of IL-18 are deleted; all of these modifications should be made within the range that does not substantially lose the property of osteoclast formation by IL-18 among the inherent property of IL-18. Examples of such functional equivalents are described along with their detailed

amino acid sequences in Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present applicant, i.e., those which substantially retain the inherent property of IL-18 and have an improved stability. The functional equivalents as referred to in the present invention further include glycosylated polypeptides thereof. Any of these IL-18 and functional equivalents thereof, both of which are included to and referred to as "IL-18" in the present invention, unless specified otherwise, can be used in the present invention independently of their origins; those prepared by separating from natural sources such as cell cultures and from artificially synthesized ones using recombinant DNA technology and peptide synthesis.

With economical viewpoint, methods of recombinant DNA technology are advantageously used; generally, desired IL-18 can be obtained by introducing DNAs encoding IL-18 into appropriate hosts derived from microorganisms, plants, and animals to form transformants, culturing the transformants in nutrient culture media in a conventional manner, and purifying the cultures by conventional methods used for purifying cytokines. Any DNAs can be used as the above DNAs as long as they contain a DNA encoding IL-18, and can be suitably selected depending on the purpose of the use of the present osteoclastgenic inhibitory agent or on the recombinant DNA technology used. For example, Japanese Patent Kokai Nos. 193,098/96, 231,598/96, and 27,189/96 by the same applicant of the present invention disclose in detail methods for producing IL-18 by culturing transformed microorganisms into which DNAs including a cDNA encoding mouse

or human IL-18 are introduced; and Japanese Patent Application No. 185,305/96 by the same applicant of the present invention discloses in detail a method for producing IL-18 encoding human IL-18 by culturing transformed animal cells which have an introduced DNA that includes a chromosomal DNA encodes human IL-18. Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present invention discloses in detail a method for producing IL-18 by culturing transformed animal cells having an introduced DNA which includes a DNA encoding a functional equivalent of human IL-18.

The aforesaid recombinant DNA technology has an economical advantage, but depending on the hosts and DNA sequences used, the IL-18 thus obtained may have somewhat different physicochemical property from those of IL-18 produced and functions *in vivo*. Japanese Patent Application No. 67,434/96 by the same applicant of the present invention discloses in detail a preparation of IL-18 using established human cell lines as natural sources, and Japanese Patent Application No. 213,267/96 by the same applicant also discloses in detail the preparation using an interleukin-1 β -converting enzyme. The IL-18 obtained by those preparations can be estimated to have substantially the same or equal physicochemical property to that of IL-18 that is produced and functions *in vivo*, and the yield can be estimated to be slightly lower. However, such IL-18 has an advantage that it has a fewer side effects when used as pharmaceuticals directed to administering to warm-blooded animals in general and including humans. When applying purification methods using monoclonal

antibodies specific to IL-18, as disclosed in Japanese Patent Application No. 231,598/96 by the same applicant of the present invention, a relatively-high purity IL-18 can be obtained in a minimum labor and cost.

The present osteoclastgenic inhibitory agent comprising the aforesaid IL-18 includes any types and forms usable to inhibit osteoclast formation both *in vivo* and *in vitro*. The present agent can be advantageously used as ingredients for cell culture media for animal cells, which satisfactorily inhibit osteoclast formation, maintain, proliferate, and/or differentiate the desired cells; components of screening kits for bone-related therapeutic agents; bone-resorption regulatory agents; and agents for osteoclast-related diseases. The bone-resorption regulatory agents include medicaments and health foods that exert an osteoclastgenic inhibitory activity *in vivo*, control bone resorption to normal conditions, and improve unfavorable physical conditions such as a relatively-insignificant arthralgia. The agents for osteoclast-related diseases include medicaments used to prevent and/or treat diseases caused by an excessive osteoclast formation and/or its function. Examples of such diseases are hypercalcemia, osteoclastoma, Behcet's syndrome, osteosarcoma, arthropathy, chronic rheumatoid arthritis, deformity ostitis, primary hyperthyroidism, osteopenia, and osteoporosis. Varying depending on the types of agents and diseases to be treated, the present agent is usually formulated into a liquid, paste, or solid form which contains 0.000002-100 w/w %, preferably, 0.0002-0.5 w/w % of IL-18.

The present osteoclastogenic inhibitory agent can be IL-18 alone or compositions comprising IL-18 and one or more other ingredients such as carriers, excipients, diluents, adjuvants, antibiotics, and proteins such as serum albumin and gelatin as stabilizers; saccharides such as glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, trehalose, sucrose, isomaltose, lactose, panose, erlose, palatinose, lactosucrose, raffinose, fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, lentinan, dextrin, pullulan, and sugar alcohols including sorbitol, maltitol, lactitol, and maltotriitol; buffers comprising phosphates or citrates mainly; and reductants such as 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, and reduced glutathione; and optionally biologically active substances such as interferon- α , interferon- β , interferon- γ , interleukin-2, interleukin-3, interleukin-6, interleukin-12, TNF- α , TNF- β , GM-CSF, estrogen, progesterone, chlormadinone acetate, calcitonin, somatokine, somatomedin, insulin-like growth factor, ipriflavone, parathyroid hormone (PTH), norethisterone, busulfan, ancitabine, cytarabine, fluorouracil, tetrahydrofurfuryl fluorouracil, methotrexate, vitamin D₂, active vitamin D, Krestin[®] or polysaccharide K, L-asparaginase, and OK-432 or Picibanil[®]; and calcium salts such as calcium lactate, calcium chloride, calcium monohydrogenphosphate, and L-calcium L-aspartate. When used as agents for administering to warm-blooded animals in general and including humans, i.e., agents for osteoclast-related diseases, the present agent can be preferably formulated into compositions by appropriately combining with one or more of the above physiologically-acceptable substances.

The present osteoclastogenic inhibitory agent includes medicaments in a unit dose form used for administering to warm-blooded animals in general and including humans. The wording "**unit dose form**" means those which contain IL-18 in an amount suitable for a daily dose or in an amount up to four fold by integers or up to 1/40 fold of the dose, and those in a physically separated and formulated form suitable for prescribed administrations. Examples of such formulations are injections, liquids, powders, granules, tablets, capsules, troches, collyriums, nebulas, and suppositories.

The present agent as an agent for osteoclast-related diseases effectively treat and prevent osteoclast-related diseases independently of oral and parenteral administrations. Varying depending on the types and symptoms of patients' diseases, the present agent can be administered to the patients orally, intradermally, subcutaneously, muscularly, or intravenously at a dose of about 0.5 µg to 100 mg per shot, preferably, at a dose of about 2 µg to 10 mg per shot of IL-18, 2-6 fold a day or 2-10 fold a week for one day to one year.

In the below, with reference to experiments, the preparation, physicochemical property, and biological activity of the IL-18 according to the present invention are described:

Experiment 1

Preparation of human IL-18

According to the method in Japanese Patent Kokai No. 231,598/96 by the same applicant of the present invention, an autonomously-replicable recombinant DNA, **pKGFHH2**, linked to a cDNA encoding human IL-18, was prepared. Dideoxyribonucleotide

sequencing analyzed that, as shown in FIG. 1, in the recombinant DNA, cDNA KGFHH2 containing the base sequence of SEQ ID NO: 8 was linked to the downstream of Ptac, a Tac promoter. The recombinant DNA pKGFHH2 contained the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1 to 5; these amino acid sequences were respectively encoded by nucleotides 46-63, 88-105, 400-420, 151-165, and 214-228 in SEQ ID NO: 8.

According to the method in Japanese Patent Kokai No. 231,598/96, the recombinant DNA pKGFHH2 was introduced into an *Escherichia coli* Y1090 strain, ATCC 37197, and the strain was cultured. The produced polypeptide was purified by immunoaffinity chromatography to obtain a purified human IL-18 with a purity of at least 95% in a yield of about 25 mg/l culture. According to the method in Japanese Patent Kokai No. 193,098/96 by the same applicant of the present invention, the purified human IL-18 was analyzed for biological activity and physicochemical property as indicated below: When culturing human lymphocytes, collected by a conventional manner from a healthy donor, in the presence of the purified human IL-18, IFN- γ production was observed depending on the concentration of IL-18, resulting in a confirmation that IL-18 has an activity of inducing IFN- γ production by lymphocytes as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified IL-18 was subjected to SDS-PAGE, resulting in a major band with an IFN- γ inducing activity at a position corresponding to 18,500 \pm 3,000 daltons. The IL-18 gave a PI of 4.9 \pm 1.0 as determined by conventional chromatofocusing. Conventional

analysis using "PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A", an apparatus of Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA, revealed that the IL-18 had the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9, i.e., the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 where a methionine residue was linked to the N-terminus.

Experiment 2

Preparation of human IL-18

According to the method in Japanese Patent Application No. 67,434/96 by the same applicant of the present invention, THP-1 cells, ATCC TIB 202, a human monocyte cell line derived a male with acute monocytic leukemia, were inoculated to the dorsum subcutaneous tissues of new born hamsters, followed by feeding the hamsters for three weeks. Tumor masses, about 15 g weight each, formed in the subcutaneous tissues of each hamster, were extracted, dispersed in media, and disrupted. The polypeptide obtained from the disrupted cells was purified by immunoaffinity chromatography to obtain a purified human IL-18 in a yield of an about 50 ng/head.

Similarly, according to the method in Japanese Patent Application No. 67,434/96, the purified human IL-18 was analyzed and determined for biological activity and physicochemical property as indicated below: It was confirmed that culturing human lymphocytes, collected from healthy donors in a conventional manner, in the presence of different concentrations of the human IL-18, resulted in an IL-18 dose-dependent IFN- γ production. This revealed that the human IL-18 has a biological activity of inducing IFN- γ production by lymphocytes as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported

by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified human IL-18 was subjected to SDS-PAGE using 2 w/v % dithiothreitol as a reductant, resulting in a major band with an IFN- γ production inducing activity at a position corresponding to 18,000-19,500 daltons. According to the peptide map disclosed in Japanese Patent Application No. 67,434/96, the human IL-18 was treated with clostripain commercialized by Sigma Chemical Company, Missouri, USA, to obtain polypeptide fragments, followed by subjecting the fragments for fractionation to high-performance liquid chromatography (HPLC) using "ODS-120T", a column commercialized by Tosoh Corporation, Tokyo, Japan, and analyzing the amino acid sequences of the fragments from the N-terminus to reveal the following amino acid sequences of SEQ ID NOS: 10 to 13. These amino acid sequences were completely coincided with amino acids 148-157, 1-13, 45-58, and 80-96 in SEQ ID NO: 6. The data shows that the human IL-18 obtained in Experiment 2 has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6 and all the partial amino acid sequences of SEQ ID NOS: 1 to 5.

Experiment 3

Preparation of functional equivalents

According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present invention, it was prepared an autonomously-replicable recombinant DNA, pCSHIGIF/MUT35, linked to a DNA encoding a functional equivalent of human IL-18 where cysteines 38, 68, and 76 in SEQ ID NO: 6 were respectively replaced with serine, serine, and alanine. Dideoxyribonucleotide sequence analysis revealed that as shown

in FIG. 2, in the recombinant DNA, DNA IGIF/MUT35 with SEQ ID NO: 14 was linked to the downstream of a base sequence encoding a signal peptide of subtype α 2b in human interferon- α in the same reading-frame, as reported by K. Henco et al., in *Journal of Molecular Biology*, Vol. 185, pp. 227-260 (1985), and had a stop codon for protein synthesis at further downstream. As shown in parallel in SEQ ID NO: 14, the amino acid sequence encoded by the recombinant DNA corresponded to SEQ ID NO: 6 where cysteines 38, 68, and 76 in SEQ ID NO: 6 were respectively replaced with serine, serine, and alanine. The recombinant DNA contained a nucleotide which encodes all the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 1 to 4 and the one of SEQ ID NO: 5 where cysteine at amino acid 5 in SEQ ID NO: 5 was replaced with alanine. These amino acid sequences were respectively encoded by nucleotides 46-63, 88-105, 400-420, 151-165, and 214-228 in SEQ ID NO: 14.

According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present invention, the recombinant DNA pCSHIGIF/MUT35 was introduced into COS-1 cells, ATCC CRL 1650, an established cell line derived from SV40 transformed African Green monkey kidney, followed by culturing the transformed cells. The produced polypeptide in the culture was purified by immunoaffinity chromatography to obtain a purified functional equivalent of human IL-18 in a yield of about 40 ng/ml culture. According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97, the purified functional equivalent was analyzed and determined for biological activity and physicochemical property as indicated below: When culturing

KG-1 cells, ATCC CCL 246, an established cell line derived from human acute myelogenous leukemia, in the presence of different concentrations of the purified functional equivalent of human IL-18, IFN- γ production was observed depending on the concentration of the IL-18, revealing that the IL-18 has a biological activity of inducing IFN- γ production by KG-1 cells as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified functional equivalent was subjected to SDS-PAGE in the presence of 2 w/v % dithiothreitol as a reductant, resulting in a major band with an IFN- γ production inducing activity at a position corresponding to 18,000-19,500 daltons. Conventional analysis using "PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A", an apparatus of Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA, revealed that the N-terminal region of the functional equivalent had the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 which corresponded to the amino acid sequence in the N-terminal region as shown in parallel in SEQ ID NO: 14.

Experiment 4

Preparation of functional equivalent

According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present invention, it was prepared an autonomously-replicable recombinant DNA, pCSHIGIF/MUT42, which was linked to a DNA encoding for a functional equivalent of human IL-18 where cysteines 38, 68, 76, and 127 in SEQ ID NO: 6 were respectively replaced with serine, serine, alanine, and serine. Dideoxyribonucleotide sequencing revealed that, as shown in FIG. 3, in the recombinant DNA, DNA

IGIF/MUT42 with SEQ ID NO: 16 was linked to the downstream of a base sequence encoding a signal peptide for subtype α 2b of human interferon- α in the same reading frame, as reported by K. Henco et al., in *Journal of Molecular Biology*, Vol. 185, pp. 227-260 (1985), and had a stop codon for protein synthesis at further downstream. As shown in parallel in SEQ ID NO: 16, the amino acid sequence encoded by the recombinant DNA corresponded to SEQ ID NO: 6 where cysteines 38, 68, 76, and 127 in SEQ ID NO: 6 were respectively replaced with serine, serine, alanine, and serine. The recombinant DNA contained a nucleotide sequence which encodes all the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 1 to 4 and the one of SEQ ID NO: 5 where cysteine 5 in SEQ ID NO: 5 was replaced with alanine. These amino acid sequences were respectively encoded by nucleotides 46-63, 88-105, 400-420, 151-165, and 214-228 in SEQ ID NO: 16.

According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97 by the same applicant of the present invention, the recombinant DNA pCSHIGIF/MUT42 was introduced into COS-1 cells, followed by culturing the cells. The produced polypeptide in the culture was purified by immunoaffinity chromatography to obtain a purified functional equivalent of human IL-18 in a yield of about 20 ng/ml culture. According to the method in Japanese Patent Application No. 20,906/97, the purified functional equivalent was analyzed and determined for biological activity and physicochemical property as indicated below: When cultured KG-1 cells in the presence of different concentrations of the purified functional equivalent, a dose-dependent IFN- γ production was observed, and this revealed that

the functional equivalent has a biological activity of inducing IFN- γ production by KG-1 cells as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified functional equivalent was subjected to SDS-PAGE in the presence of 2 w/v % dithiothreitol as a reductant, resulting in a major band with an IFN- γ inducing activity at a position corresponding to 18,000-19,500 daltons. Conventional analysis using "**PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A**", an apparatus of Applied Biosystems, Inc., Foster City, USA, revealed that the N-terminal region of the functional equivalent had the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 which completely corresponded to the amino acid sequence in the N-terminal region as shown in parallel in SEQ ID NO: 16.

Experiment 5

Preparation of human IL-18

According to the method in Japanese Patent Application No. 185,305/96 by the same applicant of the present invention, an autonomously-replicable recombinant DNA, **pBGHuGF**, linked to a chromosomal DNA encoding human IL-18, was obtained. Dideoxyribonucleotide sequencing analysis revealed that as shown in FIG. 4, in the recombinant DNA, a chromosomal DNA, which encodes human IL-18, i.e., DNA HuIGIF with SEQ ID NO: 17, was linked to the downstream of a restriction site by a restriction enzyme, *Hind* III. As shown in SEQ ID NO: 17, the chromosomal DNA HuIGIF consists of 11,464 bp where the exon was fragmented by four introns positioning at nucleotides 83-1,453, 1,466-4,848, 4,984-6,317, and 6,452-11,224. Among the resting nucleotide sequence excluding these introns, nucleotides 3-

11,443 from the 5'-terminus are the part that encodes a precursor of human IL-18, and nucleotides 4,866-4,983 are the part that encodes an active human IL-18. The chromosomal DNA contained nucleotides sequences encoding SEQ ID NOS: 1 to 5; these amino acid sequences were respectively encoded by nucleotides 4,911-4,928, 4,953-4,970, 11,372-11,392, 6,350-6,364, and 6,413-6,427 in SEQ ID NO: 17.

According to the method in Japanese Patent Application No. 185,305/96, the recombinant DNA pBGHuGF was introduced into CHO-K1 cells, ATCC CCL 61, an established cell line derived from Chinese hamster ovary, followed by culturing the cells. The culture supernatant was contacted with a supernatant of cell disruptant prepared from a THP-1 cell culture to produce a polypeptide which was then purified by immunoaffinity chromatography to obtain a purified human IL-18 in a yield of about 15 mg/l culture. According to the method in Japanese Patent Application No. 185,305/96, the polypeptide was analyzed and determined for biological activity and physicochemical property as indicated below: It was confirmed that human lymphocytes, which were collected from a healthy donor, produced IFN- γ depending on the purified human IL-18 concentration when cultured at different concentrations of the human IL-18, revealing that the human IL-18 has a biological activity of inducing IFN- γ production by lymphocytes as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified human IL-18 was subjected to SDS-PAGE in the presence of 2 w/v % dithiothreitol as a reductant, resulting in a major band with

an IFN- γ inducing activity at a position corresponding to 18,000-19,500 daltons. The N-terminal region of the human IL-18 contained the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15 which completely corresponded to the amino acid sequence in the N-terminal region of SEQ ID NO: 17 for an active IL-18.

Experiment 6

Preparation of mouse IL-18

To a 0.5-ml reaction tube were added 8 μ l of 25 mM magnesium chloride, 10 μ l of 10 \times PCR buffer, one μ l of 25 mM dNTP mix, one μ l of 2.5 units/ μ l of ampliTaq DNA polymerase, one μ g of a recombinant DNA, which encodes mouse IL-18 having the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 18 and the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, prepared from a phage DNA clone according to the method in Japanese Patent Kokai No. 27,189/96, and adequate amounts of a sense and antisense primers having nucleotide sequences represented by 5'-ATAGAATTCAAATGAACTTGGCCGACTTCAGTG-3' and 5'-ATAAAGCTTCTAACCTTGATGTAAGTT-3', respectively, which were chemically synthesized based on the amino acid sequences nearness to the N- and C-termini of SEQ ID NO: 7, and the mixture solution was brought up to a volume of 100 μ l with sterilized distilled water. The solution thus obtained was subjected in a usual manner to PCR reaction of the following three cycles of successive incubations at 94°C for one minute, 43°C for one minute, and 72°C for one minute, and further 40 cycles of successive incubations at 94°C for one minute, 60°C for one minute, and 72°C for one minute.

The product obtained by the PCR reaction and "pCR-Script SK (+)", a plasmid vector commercialized by Stratagene

Cloning Systems, California, USA, were in a conventional manner ligated together using a DNA ligase into a recombinant DNA which was then introduced into "XL-1 Blue MRF'Kan", an *Escherichia coli* strain commercialized by Stratagene Cloning Systems, California, USA., to obtain a transformant. The transformant was inoculated to L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml ampicillin, followed by the incubation at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The culture was centrifuged to obtain the proliferated transformants which were then treated with a conventional alkali-SDS method to isolate a recombinant DNA. A portion of the recombinant DNA isolated was analyzed by dideoxyribonucleotide sequencing, revealing that the recombinant DNA contained restriction sites of *Eco RI* and *Hind III* at the 5'- and 3'-termini of SEQ ID NO: 18, respectively, and a DNA containing a methionine codon for initiating polypeptide synthesis and a TAG codon for terminating polypeptide synthesis, which were located in just before and after the N- and C-termini of the amino acid sequence as shown in parallel in SEQ ID NO: 18. The recombinant DNA contained the nucleotide sequences of SEQ ID NOs: 1 to 5. These amino acid sequences were encoded by nucleotides 46-63, 85-102, 394-414, 148-162, and 211-225 in SEQ ID NO: 18.

The remaining portion of the recombinant DNA was in a conventional manner cleaved with restriction enzymes of *Eco RI* and *Hind II*, and 0.1 µg of the resulting *Eco RI-Hind III* DNA fragments, obtained by using "**DNA LIGATION KIT VER 2**", a DNA ligation kit commercialized by Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan, and 10 ng of pKK223-3, a plasmid vector commercialized

by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been cleaved with a restriction enzyme, were linked by incubating at 16°C for 30 min into an autonomously-replicable recombinant DNA, pKGFMH2. Using competent cell method, an *Escherichia coli* Y1090 strain, ATCC 37197, was transformed using the recombinant DNA pKGFMH2, and the resulting transformant, KGFMH2, was inoculated to L-broth (pH 7.2) containing 50 µg/ml ampicillin, and cultured at 37°C for 18 hours under shaking conditions. The culture was centrifuged to collect the proliferated transformants, followed by applying a conventional SDS-alkali method to a portion of the transformants to extract the recombinant DNA pKGFMH2. Dideoxyribonucleotide sequencing analysis revealed that, as shown in FIG. 5, KGFMH2 cDNA containing the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 18 was linked to the downstream of the Tac promoter in the recombinant DNA pKGFMH2.

Ampicillin was added to L-broth (pH 7.2), which had been sterilized by autoclaving, to give a concentration of 50 µg/ml, cooled to 37°C, and inoculated with the transformant KGFMH2, followed by the culture at 37°C for 18 hours. Eighteen liters of a fresh preparation of the same culture medium was placed in a 20-l jar fermenter, similarly sterilized as above, admixed with ampicillin, cooled to 37°C, and inoculated with one v/v % of the seed culture obtained in the above, followed by the culture at 37°C for 8 hours under aeration-agitation conditions. The resulting culture was centrifuged to collect the cultured cells which were then suspended in a mixture solution (pH 7.3) containing 150 mM sodium chloride, 16 mM disodium

hydrogenphosphate, and 4 mM sodium dihydrogenphosphate, disrupted by ultrasonication, and centrifuged to remove cell disruptant, and this yielded an about two liters of a supernatant.

To an about two liters of the supernatant was added 10 mM phosphate buffer (pH 7.3) containing ammonium sulfate to give a 40% ammonium saturation. The resulting sediment was removed by centrifugation, and the supernatant was mixed with ammonium sulfate to give an 85% ammonium saturation, allowed to stand at 4°C for 18 hours, and centrifuged at about 8,000 rpm for 30 min to obtain a newly formed sediment. The sediment thus obtained was dissolved in 10 mM phosphate buffer (pH 6.6) containing 1.5 M ammonium sulfate to give a total volume of about 1,300 ml, and the solution was filtered, and fed to a column packed with about 800 ml of "**PHENYL SEPHAROSE CL-6B**", a gel commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, followed by washing the column with a fresh preparation of the same buffer and feeding to the column a linear gradient buffer of ammonium sulfate decreasing from 1.5 M to 0 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.6) at an SV (space velocity) 1.5. Fractions eluted at around 1 M ammonium sulfate were pooled, concentrated using a membrane filter, and dialyzed against 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) at 4°C for 18 hours. The dialyzed solution was fed to a column packed with about 55 ml of "**DEAE-5PW**", a gel commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 6.5). The column was washed with a fresh preparation of the same buffer, and fed with a linear gradient

buffer of sodium chloride increasing from 0 M to 0.5 M in 10 mM phosphate buffer (pH 6.5) at SV 5.5, followed by collecting fractions eluted at around 0.2 M sodium chloride. Thereafter, the fractions were pooled and concentrated similarly as above up to give an about nine milliliters, followed by dialyzing the concentrate against PBS (phosphate buffered saline) at 4°C for 18 hours, and feeding the dialyzed solution to a column packed with "**SUPERDEX 75**", a gel commercialized by Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden, which had been equilibrated with a fresh preparation of the same PBS. The column was fed with a fresh preparation of the same PBS to collect fractions with an IFN- γ inducing activity, and the fractions were pooled and concentrated with a membrane filter to obtain a purified mouse IL-18 in a yield of about 350 $\mu\text{g}/\ell$ culture.

According to the method in Japanese Patent Kokai No. 27,189/96, the purified mouse IL-18 was analyzed and determined for biological activity and physicochemical property as indicated below: Culturing mouse spleen cells, collected by a conventional manner, under different concentrations of the mouse IL-18 resulted in an IFN- γ production depending on the concentrations of the mouse IL-18, and this revealed that the mouse IL-18 has an activity of inducing IFN- γ production by spleen cells as an immunocompetent cell. In accordance with the method as reported by U. K. Laemmli in *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685 (1970), the purified human IL-18 was subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions, resulting in a major band with an IFN- γ inducing activity at a position corresponding to 19,000 \pm 5,000 daltons. The N-terminal region of the mouse IL-18

contained the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19 which corresponded to the N-terminal region of SEQ ID NO: 18.

With reference to Experiment 7, the biological activity of the IL-18 according to the present invention will be described in more detail, and Experiment 8 describes the cytotoxicity of the IL-18:

Experiment 7

Biological activity

Experiment 7-1

Induction of GM-CSF production

Using a heparinized syringe, blood was collected from a healthy volunteer and diluted two fold with serum-free RPMI 1640 medium (pH 7.4). The diluent was overlaid on a ficoll and centrifuged, and the collected lymphocytes were washed with RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal calf serum, and suspended in a fresh preparation of the same medium to give a cell density of 1×10^6 cells/ml, followed by distributing the cell suspension to a 12-well microplate by two ml/well.

Using RPMI 1640 medium (pH 7.4) supplemented with 10 v/v % fetal calf serum, an IL-18 preparation obtained by the method in Experiment 1 was prepared into a one $\mu\text{g}/\text{ml}$ solution which was then distributed to the above microplate by 20-200 $\mu\text{l}/\text{well}$. To the microplate was further added a fresh preparation of the same buffer, supplemented with 500 $\mu\text{l}/\text{ml}$ of Concanavalin A, by 10 $\mu\text{l}/\text{well}$, followed by the incubation at 37°C for 48 hours in a 5 v/v % CO₂ incubator. After completion of the culture, supernatants in each well were sampled by 0.1

ml/well, and determined for GM-CSF content using a conventional enzyme immunoassay. In parallel, a culture system free of IL-18 as a control was provided and treated similarly as above. The data is in Table 1:

Table 1

IL-18*	GM-CSF yield (pg/ml)
0	510
0.7	2,150
2.8	3,050
5.6	3,950

Note: The symbol "*" means that IL-18 was added to the culture system in the presence of 2.5 µg/ml of Concanavalin A.

The results in Table 1 indicate that lymphocytes as an immunocompetent cell produced GM-CSF depending on the concentration of IL-18 when contacted with IL-18 in the presence of Concanavalin A as a cofactor. It was also confirmed that all of the IL-18 preparations and functional equivalents thereof, which were obtained by the methods in Experiments 2 to 5, induced GM-CSF production even when used alone similarly as above. An IL-18 preparation obtained by the method in Experiment 6 was tested in accordance with Experiment 7-1 except that the human lymphocytes used in the experiment were replaced with spleen cells prepared from mouse by a conventional manner, revealing that the IL-18 preparation also induced GM-CSF production.

Experiment 7-2

Inhibition of osteoclast formation

Experiment 7-2(a)

As reported by T. J. Martin et al in *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol. 56, pp. 357-366 (1994), it is considered requisite for contacting osteoclastic precursor cells, derived from hematopoietic stem cells, with osteoblasts or bone marrow stromas to generally differentiate osteoclastic precursor cells into mature osteoclasts. As described by G. D. Roodman in *Endocrine Reviews*, Vol.17, No.4, pp.308-332 (1996), it is generally recognized that osteoclasts have characters of multinucleated cells, tartaric acid-resistant acid phosphatase (hereinafter abbreviated as "TRAP") activity, and a calcitonin receptor. In a co-culture system of osteoblasts and bone marrow cells as reported by N. UDAGAWA in *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 182, pp. 1,461-1,468 (1995), these cells respond to factors such as $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, adrenocortical hormone, interleukin 1, interleukin 6, and interleukin 11, to form osteoclast-like cells (hereinafter may be abbreviated as "OCL"). The formed OCL has characters of osteoclasts *in vivo*. Therefore, the co-culture system well reflects *in vitro* the processes of osteoclast formation *in vivo*. Using this system, experiments for osteoclast formation and osteoclastgenic inhibitory agents can be carried out.

The osteoclastgenic inhibitory activity of the IL-18 according to the present invention was studied using the above co-culture system. The osteoblasts used in this experiment were prepared in a conventional manner by treating a newborn mouse calvaria with 0.1 w/v % collagenase commercialized by

Worthington Biochemical Co., Freefold, Australia, and 0.2 w/v % dispase commercialized by Godo Shusei Co., Ltd., Tokyo, Japan. The bone marrow cells were prepared from a mature mouse in a conventional manner. As a negative control, 2×10^4 cells of a primary cell culture of osteoblasts and 5×10^5 cells of bone marrow cells were co-cultured in each well of a 48-well microplate containing 0.4 ml/well of α -MEM medium supplemented with 10 v/v % fetal calf serum (hereinafter designated as "Medium" throughout Experiment 4-2) at 37°C for seven days in a 5 v/v % CO₂ incubator. As a positive control, the above two-types of cells were co-cultured similarly as in the negative control except that they were cultured in other wells containing 10^{-8} M of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ commercialized by Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan, and 10^{-7} M of prostaglandin E₂ commercialized by Sigma Chemical Company, Missouri, USA. The aforesaid two-types of cells were co-cultured similarly as in the positive control except that they were cultured in other wells containing 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ commercialized by Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan, and prostaglandin E₂ commercialized by Sigma Chemical Company, Missouri, USA., in the same concentrations as used in the positive control, and a concentration of 0.01-10 ng/ml of an IL-18 preparation prepared by the method in Experiment 6. In every co-culture system, the media in each well were replaced with fresh preparations of the same media used in the co-culture systems on the 3rd day after the initiation of each culture. According to the method by N. UDAGAWA in *Journal of Experimental Medicine*, Vol. 182, pp. 1,461-1,468 (1995), the cells on the 6th day after the

initiation of each culture were fixed and stained based on TRAP activity, followed by counting the stained cells (hereinafter called "**TRAP-positive cells**") per well. Throughout Experiment 4-2, quadruplet wells under the same conditions were provided for each co-culture system, and the mean value for the TRAP-positive cells per well in each system was calculated. The results are in Table 2:

Table 2

IL-18 (ng/ml)	Osteoclastgenic formation factor*1	Number of TRAP-positive cells per well*2
0	-	2
0	+	110
0.01	+	114
0.1	+	111
0.5	+	106
1	+	63
2	+	29
4	+	12
8	+	2
10	+	2

Note: *1: The symbols of "+" and "-" show co-culture systems with and without 10^{-8} M 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and 10^{-7} M prostaglandin E₂, respectively.

*2: It shows a mean value of the data from quadruplet wells cultured under the same conditions.

As shown in Table 2, the formation of TRAP-positive cells was not substantially observed in the negative control, but the distinct formation was observed in the positive control. In the co-culture systems, i.e., the positive control supplemented additionally with IL-18, the formation of TRAP-positive cells was inhibited depending on the concentration of IL-18, and the maximum inhibition, i.e., a level equal to that in the negative control, was found at eight ng/ml or more of IL-18. These data strongly indicates that IL-18 has a concrete activity of inhibiting OCL formation *in vitro* and also inhibits osteoclast formation.

Experiment 7-2(b)

As described hereinbefore, it was confirmed that there exist factors that induce the formation of osteoclast-like cells in the co-culture systems used throughout Experiment 7-2. Therefore, in this Experiment 7-2(b), it was studied whether the inhibitory activity of IL-18 on osteoclast formation observed in Experiment 7-2(a) was specific to some factors or not; the osteoclast-like cells were cultured by the same method as used in the negative control in Experiment 7-2(a) except for using a medium supplemented with 10^{-8} M $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃, 10^{-7} M prostaglandin E₂, 200 ng/ml parathyroid hormone, 100 ng/ml interleukin 1, or 20 ng/ml interleukin 11. These culture systems were for positive controls. In parallel, the cells were cultured in other wells by the same method used in the positive controls except for using a medium containing 10 ng/ml of an IL-18 preparation obtained by the method in Experiment 6, in addition to any one of the above factors at the same

concentration. After completion of the cultures, TRAP-positive cells in each well were counted, and the numbers were compared similarly as in Experiment 7-2(a). The results are in Table 3:

Table 3

Osteoclast formation factor*1 (concentration)		IL-18*2		Number of TRAP-positive cells per well*3	
D_3 ($10^{-8}M$)	-			94	
	+			3	
PGE_2 ($10^{-7}M$)	-		77		
	+			3	
PTH (200 ng/ml)	-			63	
	+			3	
$IL-11$ (100 ng/ml)	-		84		
	+			3	
$IL-1$ (20 ng/ml)	-		71		
	+			3	

Note: *1: D_3 , PGE_2 , PTH , $IL-11$, and $IL-1$ are respectively $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 , prostaglandin E_2 , parathyroid hormone, interleukin-11, and interleukin-1 which were added to wells to give the concentrations as indicated in parentheses.
 *2: The symbol "+" means that $IL-18$ was added to a well to give a concentration of 10 ng/ml, and the symbol "-" means that $IL-18$ was not added to.
 *3: It shows a mean value of the data from quadruplet wells cultured under the same conditions.

As shown in Table 3, a distinct formation of TRAP-positive cells was observed in every positive control, but the formation was almost completely inhibited in the presence of IL-18. This strongly indicates that IL-18 has a wide and general activity of inhibiting osteoclast formation independently of osteoclast-formation-related factors.

Experiment 7-2(c)

It was studied whether the osteoclastogenic inhibition by IL-18, confirmed in Experiments 7-2(a) and 7-2(b), was caused by the action of the IL-18-induced GM-CSF. For positive and negative controls, the same co-culture systems employed in Experiment 7-2(a) were used. Using other wells, the co-culture of osteoblasts and bone marrow cells was carried out similarly as the method used for the positive controls except for using a medium supplemented with $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and prostaglandin E₂ at the same concentrations used in the positive control, and with (i) 10 µg/ml of an anti-mouse GM-CSF polyclonal antibody commercialized by R&D Systems, Minnesota, USA, (ii) 10 ng/ml of an IL-18 preparation obtained by the method in Experiment 6, (iii) (ii) plus 10 µg/ml of an anti-mouse polyclonal antibody, (iv) 0.1 ng/ml of a mouse GM-CSF commercialized by R&D Systems, Minnesota, USA, or (v) (iv) plus 10 µg/ml of an anti-mouse GM-CSF polyclonal antibody. After completion of the culture, TRAP-positive cells in each well were counted, and the numbers were compared similarly as in Experiment 7-2(a). The data is shown in Table 4 where the symbols "i" to "v" coincide with those used in the co-culture systems other than the control systems.

Table 4

Culture system ^{*1}	Osteoclastgenic factor ^{*2}	IL-18 ^{*3}	GM-CSF ^{*4}	Anti-GM-CSF antibody ^{*5}	Number of TRAP-positive cells per well ^{*6}
N	-	-	-	-	3
P	+	-	-	-	122
i	+	-	-	+	112
ii	+	+	-	-	3
iii	+	+	-	+	111
iv	+	-	+	-	4
v	+	-	+	+	106

Note: *1; where the symbols "N" and "P" mean negative and positive controls, respectively, and the symbols "i" to "v" correspond to those in the five types co-culture systems used.

*2; where the symbol "+" means that 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and prostaglandin E₂ were respectively added to a well to give respective concentrations of 10⁻⁶M and 10⁻⁷M, and the symbol "-" means that these compounds were not added to.

*3; The symbol "+" means that IL-18 was added to a well to give a concentration of 10 ng/ml, and the symbol "-" means that IL-18 was not added to.

*4; The symbol "+" means that GM-CSF was added to a well to give a concentration of 0.1 ng/ml, and the symbol "-" means that GM-CSF was not added to.

*5; The symbol "+" means that an anti-GM-CSF polyclonal antibody was added to a well to give a concentration of 10 μ g/ml, and the symbol "-" means that the polyclonal antibody was not added to.

As shown in Table 4, the formation of TRAP-positive cells was almost completely inhibited by IL-18, cf., the co-culture system (ii), but the inhibition was almost completely inhibited by the addition of the anti-mouse polyclonal antibody, cf., the co-culture system (iii). Mouse GM-CSF exhibited an activity of inhibiting the formation of TRAP-positive cells similar to IL-18, cf., the co-culture system (iv), and the inhibition was almost completely inhibited by the addition of the anti-mouse GM-CSF polyclonal antibody, cf., the co-culture system (v). The sole use of the anti-mouse GM-CSF polyclonal antibody gave no influence on the formation of TRAP-positive cells, cf., the co-culture system (i). These data strongly indicates that the osteoclastgenic inhibition by IL-18 was due to the action of the IL-18-induced GM-CSF.

Experiment 8

Acute toxicity test

Eight-week-old mice were in a conventional manner injected percutaneously, orally, or intraperitoneally with either of IL-18 preparations obtained by the methods in Experiments 1 to 6. The results showed that these IL-18 preparations had an LD₅₀ of about one mg/kg or more in mice independent of the route of administration. The data evidences that IL-18 can be incorporated into pharmaceuticals for warm-blooded animals in general and including humans without causing no serious side effects.

As described in *Nikkei Biotechnology Annual Report 1996*, pp. 498-499 (1995), published by Nikkei BP Publisher, Tokyo, Japan (1995), the IL-18-induced GM-CSF has not yet been

clinically used in Japan, but applied clinically in USA and Europe. The fact would show that IL-18 has substantially no serious side effects. These facts indicate that the osteoclastgenic inhibitory agent according to the present invention can be successively administered to warm-blooded animals in general and including humans to induce osteoclast formation and exert a satisfactory therapeutic and/or prophylactic effect on osteoclast-related diseases without causing serious side effects.

The following Examples describe the present osteoclastgenic inhibitory agent according to the present invention:

Example 1

Liquid

Either of IL-18 preparations, obtained by the methods in Experiments 1 to 6, was dissolved in physiological saline containing one w/v % human serum albumin as a stabilizer to give a concentration of two mg/ml of the IL-18 preparation. The resulting solutions were in a conventional manner membrane filtered for sterilization into liquids.

The liquids have a satisfactory stability and can be arbitrarily used as ingredients for cell culture and agents in the form of an injection, ophthalmic solution, or collunarium for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

Example 2

Dry agent

Fifty milligrams of either of IL-18 preparations, obtained by the methods in Experiments 1 to 6, was dissolved in 100 ml of physiological saline containing one w/v % purified gelatin as a stabilizer. The solutions thus obtained were in a conventional manner membrane filtered for sterilization, distributed to vials by one milliliter, lyophilized, and sealed with caps.

The products have a satisfactory stability and can be arbitrarily used as ingredients for cell culture and agents in the form of a dry injection for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

Example 3

Dry agent

Fifty milligrams of either of IL-18 preparations, obtained by the methods in Experiments 1 to 6, was dissolved in 100 ml of physiological saline containing one w/v % trehalose as a stabilizer. The solutions were in a conventional manner membrane filtered for sterilization, distributed to vials by one milliliter, lyophilized, and sealed with caps.

The products have a satisfactory stability and can be arbitrarily used as ingredients for cell culture and agents in the form of a dry injection for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

Example 4

Ointment

"HIVIS WAKO GEL® 104", a carboxyvinylpolymer

commercialized by Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan, and a high-purity trehalose were dissolved in a sterilized distilled water to give respective concentrations of 1.4 w/w % and 2.0 w/w %, and the solution was mixed to homogeneity with either of IL-18 preparations obtained by the methods in Experiments 1 to 6, and adjusted to pH 7.2 to obtain a paste containing about one mg of an IL-18 preparation per g of the product.

Each product thus obtained has a satisfactory spreadability and stability and can be arbitrarily used as an agent in the form of an ointment for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

Example 5

Tablet

"FINETOSE[®]", an anhydrous crystalline α -maltose powder commercialized by Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, was mixed to homogeneity with either of IL-18 preparations, obtained by the methods in Experiments 1 to 6, and "LUMIN" or 1-1'-1"-triheptyl-11-chinolyl(4)•4•4'-pentamethinchynocyanine-1,1"-dijodide. The mixtures were in a conventional manner tabletted to obtain tablets, about 200 mg weight each, containing an about two milligrams of either of the IL-18 preparations and an about two milligrams of LUMIN per tablet.

The products have a satisfactory swallowability, stability, and cell-activating activity and can be arbitrarily used as agents in the form of a tablet for regulating bone

resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

[Effect of the Invention]

As described above, the osteoclastogenic inhibitory agent according to the present invention effectively inhibits osteoclast formation. Therefore, the agent can be arbitrarily used as an ingredient for cell culture and agents for regulating bone resorption and for osteoclast-related diseases, directed to treat and/or prevent hypercalcemia, osteoclastoma, osteoporosis, etc.

Thus the present invention with these useful activities and functions is a significant invention that would greatly contribute to this field.

SEQUENCE LISTING

(1) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 6 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (v)FRAGMENT TYPE: internal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

SEQ ID NO:1:

Asn Asp Gln Val Leu Phe
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 6 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: internal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

SEQ ID NO:2:

Phe Glu Asp Met Thr Asp
1 5

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 7 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: peptide

(v)FRAGMENT TYPE: internal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

SEQ ID NO:3:

Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
1 5

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 5 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: internal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

SEQ ID NO:4:

Met Tyr Lys Asp Ser
1 5

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 5 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: internal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

SEQ ID NO:5:

Ser Thr Leu Ser Cys
1 5

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 157 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: peptide

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

SEQ ID NO:6:

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
1 5 10 15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
20 25 30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
35 40 45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
50 55 60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
65 70 75 80

Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
				85					90					95	
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
				100				105					110		
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
				115				120					125		
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
				130			135			140					
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
				145			150			155					

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 157 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

SEQ ID NO:7:

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met
				20				25					30		
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile
				35				40				45			
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser
				50				55			60				
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile
				65				70		75			80		
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser
				85				90				95			
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu
				100				105				110			
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu
				115				120				125			
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp	
				130				135			140				
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser			
				145				150			155				

(8) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 471 base pairs
 - (B)TYPE: nucleic acid
 - (C)STRANDEDNESS: double
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: cDNA
- (vi)ORIGINAL SOURCE:
 - (A)ORGANISM: human
 - (G)CELL TYPE: liver
- (ix)FEATURE:
 - (A)NAME/KEY: mat peptide
 - (B)LOCATION: 1..471
 - (C)IDENTIFICATION METHOD: E
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

SEQ ID NO:8:
 TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT 48
 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT 96
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT 144
 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC 192
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT 240
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA 288
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG 336
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA 384
 Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG 432
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC 471
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

(9) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 11 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (v)FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

SEQ ID NO:9:
 Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser
 1 5 10

(10) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 10 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (v)FRAGMENT TYPE: C-terminal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

SEQ ID NO:10:
 Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

1

5

10

(11) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 13 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: peptide

(v)FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

SEQ ID NO:11:

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg
1 5 10

(12) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 14 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: peptide

(v)FRAGMENT TYPE: internal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

SEQ ID NO:12:

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg
1 5 10

(13) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 17 amino acids
- (B)TYPE: amino acid
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: peptide

(v)FRAGMENT TYPE: internal fragment

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

SEQ ID NO:13:

Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
1 5 10 15

(14) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A)LENGTH: 471 base pairs
- (B)TYPE: nucleic acid
- (C)STRANDEDNESS: double
- (D)TOPOLOGY: linear

(ii)MOLECULE TYPE: cDNA

(ix)FEATURE:

- (A)NAME/KEY: mat peptide
- (B)LOCATION: 1..471
- (C)IDENTIFICATION METHOD: S

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

SEQ ID NO:14:

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT

48

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5				10						15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
								20		25				30		
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
								35		40			45			
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
								50		55			60			
TCT	GTG	AAG	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Ile	
						65			70		75			80		
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
						85			90			95				
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
						100			105			110				
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TGT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu	
						115			120			125				
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
						130			135			140				
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
						145			150			155				

(15) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 10 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (v)FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

SEQ ID NO:15:

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser						
1				5				10							

(16) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 471 base pairs
 - (B)TYPE: nucleic acid
 - (C)STRANDEDNESS: double
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: cDNA
- (ix)FEATURE:
 - (A)NAME/KEY: mat peptide
 - (B)LOCATION: 1..471
 - (C)IDENTIFICATION METHOD: S
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

SEQ	ID	NO:16:														
TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1				5					10					15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
						20			25				30			
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
						35		40				45				
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
						50		55		60						
TCT	GTG	AAG	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Ile	
						65		70		75		80				
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
						85			90		95					
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
						100		105			110					
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Ser	Glu	
						115		120			125					
AAA	GAG	AGA	GAC	CTT	TTT	AAA	CTC	ATT	TTG	AAA	AAA	GAG	GAT	GAA	TTG	432
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	
						130		135		140						
GGG	GAT	AGA	TCT	ATA	ATG	TTC	ACT	GTT	CAA	AAC	GAA	GAC				471
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp				
						145		150		155						

(17) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 11464 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: genomic DNA
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: human
 - (G) CELL TYPE: placenta
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: 5' UTR
 - (B) LOCATION: 1..3
 - (C) IDENTIFICATION METHOD: E
 - (A) NAME/KEY: leader peptide
 - (B) LOCATION: 4..82
 - (C) IDENTIFICATION METHOD: S
 - (A) NAME/KEY: intron
 - (B) LOCATION: 83..1453
 - (C) IDENTIFICATION METHOD: E
 - (A) NAME/KEY: leader peptide
 - (B) LOCATION: 1454..1465
 - (C) IDENTIFICATION METHOD: S
 - (A) NAME/KEY: intron

(B) LOCATION: 1466..4848
(C) IDENTIFICATION METHOD: E
(A) NAME/KEY: leader peptide
(B) LOCATION: 4849..4865
(C) IDENTIFICATION METHOD: S
(A) NAME/KEY: mat peptide
(B) LOCATION: 4866..4983
(C) IDENTIFICATION METHOD: S
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 4984..6317
(C) IDENTIFICATION METHOD: E
(A) NAME/KEY: mat peptide
(B) LOCATION: 6318..6451
(C) IDENTIFICATION METHOD: S
(A) NAME/KEY: intron
(B) LOCATION: 6452..11224
(C) IDENTIFICATION METHOD: E
(A) NAME/KEY: mat peptide
(B) LOCATION: 11225..11443
(C) IDENTIFICATION METHOD: S
(A) NAME/KEY: 3' UTR
(B) LOCATION: 11444..11464
(C) IDENTIFICATION METHOD: E

(xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

GTAGAAATGA	ATTTATTTT	CTTGCAAC	TAAGTATCTG	CTTGAGACAC	ATCTATCTCA	1530
CCATTGTCAG	CTGAGGAAAA	AAAAAAATGG	TTCTCATGCT	ACCAATCTGC	CTTCAAAGAA	1590
ATGTGGACTC	AGTAGCACAG	CTTGGATG	AAGATGATCA	TAAGAGATA	AAAGAAGAAC	1650
CTCTAGCAA	AGATGCTTCT	CTATGCC	AAAAATTCTC	CAGCTCTTAG	AATCTACAAA	1710
ATAGACTTTG	CCTGTTCAT	TGGCCTAAG	ATTAGCATGA	AGCCATGGAT	TCTGTTGTAG	1770
GGGGAGCGTT	GCATAGGAAA	AAGGGATTGA	AGCATTAGAA	TTGTCCAAA	TCAGTAACAC	1830
CTCCCTCTAG	AAATGCTTTG	GGAAGAAGCC	TGGAAGGTT	CGGGTTGGTG	GTGGGGTGGG	1890
GCAGAAAATT	CTGGAAGTAG	AGGAGATAGG	AATGGGTGGG	GCAAGAAGAC	CACATTAGA	1950
GGCCAAAAGC	TGAAAGAAAC	CATGGCATT	ATGATGAATT	CAGGGTAATT	CAGAATGGAA	2010
GTAGAGTAGG	AGTAGGAGAC	TGGTGAGAGG	AGCTAGAGTG	ATAAACAGGG	TGTAGAGCAA	2070
GACGTTCTCT	CACCCCAAGA	TGTGAAATT	GGACTTATC	TTGGAGATAA	TAGGGTTAAT	2130
TAAGCACAAT	ATGTATTAGC	TAGGGTAAAG	ATTAGTTGT	TGTAACAAAG	ACATCCAAG	2190
ATACAGTAGC	TGAATAAGAT	AGAGAATT	TCTCTCAAAG	AAAGTCTAAG	TAGGCAGCTC	2250
AGAAGTAGTA	TGGCTGGAAG	CAACCTGATG	ATATTGGAC	CCCCAACCTT	CTTCAGTCTT	2310
GTACCCATCA	TCCCCTAGTT	GTTGATCTCA	CTCACATAGT	TGAAATCAT	CATACTCCT	2370
GGGTTCATAT	CCCAGTTATC	AAGAAAGGT	CAAGAGAACT	CAGGCTCATT	CCTTCAAAG	2430
ACTCTAATTG	GAAGTTAAC	ACATCAATCC	CCCTCATATT	CCATTGACTA	GAATTAAATC	2490
ACATGGCCAC	ACCAAGTGCA	AGGAAATCTG	GAAAATATAA	TCTTTATTCC	AGGTAGCCAT	2550
ATGACTCTTT	AAAATTCA	AATAATATAT	TTTAAATAA	TCATTCTGGC	TTTGGTATAA	2610
AGAATTGATG	GTGTGGGTG	AGGAGGCCAA	AATTAAGGGT	TGAGAGCCTA	TTATTTAGT	2670
TATTACAAGA	AATGATGGTG	TCATGAATT	AGGTAGACAT	AGGGGAGTGC	TGATGAGGAG	2730
CTGTGAATGG	ATTTAGAAA	CACTGAGAG	AATCAATAGG	ACATGATT	GGGTTGGATT	2790
TGGAAAGGAG	AAGAAAGTAG	AAAAGATGAT	GCCTACATT	TTCACTTAGG	CAATTGTC	2850
CATTCACTGA	AATAGGGAAC	ACAGGAGGAA	GAGCAGGTT	TGGTGTATAC	AAAGAGGAGG	2910
ATGGATGACG	CATTCTGTT	TGGATCTGAG	ATGTCTGTG	AACTCCTAG	TGGAGATGTC	2970
CACAAACTCT	TCTACATGTG	GTTCTGAGTT	CAGGACACAG	ATTGGGCTG	GAGATAGAGA	3030
TATTGTAGGC	TTATACATAG	AAATGGCATT	TGAATCTATA	GAGATAAAA	GACACATCAG	3090
AGGAAATGTG	TAAAGTGAGA	GAGGAAAGC	CAAGTACTGT	GCTGGGGGA	ATACCTACAT	3150
TTAAAGGATG	CAGTAGAAAG	AAGCTAATAA	ACAACAGAGA	GCAGACTAAC	CAAAAGGGGA	3210
GAAGAAAAC	CAAGAGAATT	CCACCGACTC	CCAGGAGAGC	ATTTCAGAT	TGAGGGGATA	3270
GGTGTGTTGT	TGAATTTGC	AGCCTTGAGA	ATCAAGGGCC	AGAACACAGC	TTTTAGATT	3330
AGCAACAAAGG	AGTTTGGTGA	TCTCAGTGA	AGCAGCTTG	TGGTGAATG	GAGGCAGAGG	3390
CAGATTGCAA	TGAGTGAAC	AGTGAATGGG	AAGTGAAGAA	ATGATACAGA	TAATTCTTGC	3450
TAAAAGCTTG	GCTGTTAAAA	GGAGGAGAGA	AAACAAGACTA	GCTGCAAAGT	GAGATTGGGT	3510
TGATGGAGCA	GTTTAAATC	TCAAAATAAA	GAGCTTGTG	CTTTTTGAT	TATGAAAATA	3570
ATGTGTTAAT	TGTAACTAAT	TGAGGCAATG	AAAAAAGATA	ATAATATGAA	AGATAAAAAT	3630
ATAAAAACCA	CCCAGAAATA	ATGATAGCTA	CCATTGAT	ACAATATTTC	TACACTCCTT	3690
TCTATGTATA	TATACAGACA	CAGAAATGCT	TATATTTTA	TTAAAAGGGA	TTGTACTATA	3750
CCTAAGCTGC	TTTTCTAGT	TAGTGTATA	TATGGACATC	TCTCCATGGC	AACGAGTAAT	3810
TGCAAGTTATA	TTAAGTCAT	GATATTTCAC	AATAAGGGCA	TATCTTGCC	CTTTTTATT	3870
AATCAATTCT	TAATTGGTGA	ATGTTGTTT	CCAGTTGTT	GTTGTTATTA	ACAATGTTCC	3930
CATAAGCATT	CCTGTACACC	AATGTTCACA	CATTTGTCTG	ATTTTTCTT	CAGGATAAAA	3990
CCCAGGAGGT	AGAATTGCTG	GGTTGATAGA	AGAGAAAGGA	TGATTGCCAA	ATTAAAGCTT	4050
CAGTAGAGGG	TACATGCCGA	GCACAAATGG	GATCAGCCCT	AGATACCAGA	AATGGCACTT	4110
TCTCATTTCC	CCTTGGGACA	AAAGGGAGAG	AGGCAATAAC	TGTGCTGCCA	GAGTTAAATT	4170
TGTACGTGGA	GTAGCAGGAA	ATCATTGCT	GAAAATGAA	ACAGAGATGA	TGTTGTAGAG	4230
GTCCTGAAGA	GAGCAAAGAA	AATTGAAAT	TGCGGCTATC	AGCTATGGAA	GAGAGTGCTG	4290
AACTGGAAAA	CAAAAGAAGT	ATTGACAATT	GGTATGCTTG	TAATGGCACC	GATTTGAACG	4350
CTTGTGCCAT	TGTTCACAG	CAGCACTCAG	CAGCCAAGTT	TGGAGTTTG	TAGCAGAAAG	4410
ACAAATAAGT	TAGGGATT	ATATCCTGGC	CAAATGGTAG	ACAAAATGAA	CTCTGAGATC	4470
CAGCTGCACA	GGGAAGGAAG	GGAAAGACGGG	AAGAGGTTAG	ATAGGAAATA	CAAGAGTCAG	4530
GAGACTGGAA	GATGTTGTGA	TATTTAAGAA	CACATAGAGT	TGGAGTAAA	GTGTAAGAAA	4590
ACTAGAAGGG	TAAGAGACCG	GTCAGAAAGT	AGGCTATTG	AAGTTAACAC	TTCAGAGGCA	4650
GAGTAGTTCT	GAATGGTAAC	AAGAAATTGA	GTGTGCCTT	GAGAGTAGGT	TAAAAAACAA	4710
TAGGCAACTT	TATTGTAGCT	ACTTCTGGAA	CAGAAGATTG	TCATTAATAG	TTTTAGAAAA	4770

CTAAAATATA TAGCATACTT ATTTGTCAAT TAACAAAGAA ACTATGTATT TTTAAATGAG	4830
ATTTAATGTT TATTGTAG AA AAC CTG GAA TCA GAT TAC TTT GCC AAG CTT	4880
Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu	
-5 1 5	
GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC	4928
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe	
10 15 20	
ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC	4976
Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp	
25 30 35	
TGT AGA G GTATTTTT TTAATTGCA AACATAGAAA TGACTAGCTA CTTCTTCCA	5032
Cys Arg Asp	
40	
TTCTGTTTA CTGCTTACAT TGTTCCGTGC TAGTCCCAAT CCTCAGATGA AAAGTCACAG	5092
GAGTGACAAT AATTCTACTT ACAGGAAACT TTATAAGGCA TCCACGTTT TTAGTTGGGG	5152
TAAAAAAATTG GATACAATAA GACATTGCTA GGGGTCATGC CTCTCTGAGC CTGCCTTGA	5212
ATCACCAATC CCTTTATTGT GATTGCATTA ACTGTTAAA ACCTCTATAG TTGGATGCTT	5272
AATCCCTGCT TGTTACAGCT GAAAATGCTG ATAGTTTAC AGGTGTGGTG GCATCTATCT	5332
GTAATCCTAG CTACTTGGGA GGCTCAAGCA GGAGGATTGC TTGAGGCCAG GACTTTGAGG	5392
CTGTAGTACA CTGTGATCGT ACCTGTGAAT AGCCACTGCA CTCCAGCCTG GGTGATATAC	5452
AGACCTTGTC TCTAAAATTA AAAAAAAA AAAAAAAAC CTTAGGAAAG GAAATTGATC	5512
AAGTCTACTG TGCCTTCAA AACATGAATT CCAAATATCA AAGTTAGGCT GAGTTGAAGC	5572
AGTGAATGTG CATTCTTAA AAATACTGAA TACTTACCTT AACATATATT TTAAATATTT	5632
TATTAGCAT TTAAAAGTTA AAAACAATCT TTTAGAATT C ATATCTTAA AATACTCAAA	5692
AAAGTTGCAG CGTGTGTGTT GTAATACACA TTAAACTGTG GGGTTGTTG TTTGTTGAG	5752
ATGCAGTTTC ACTCTGTAC CCAGGCTGAA GTGCAGTGCA GTGCAGTGGT GTGATCTCGG	5812
CTCACTACAA CCTCCACCTC CCACGTTCAA GCGATTCTCA TGCCCTAGTC TCCCAGTAG	5872
GTGGGATTAC AGGCATGCAC CACTTACACC CGGCTAATT TTGTATTTT AGTAGAGCTG	5932
GGGTTTCACC ATGTTGGCCA GGCTGGTCTC AAACCCCTAA CCTCAAGTGA TCTGCCTGCC	5992
TCAGCCTCCC AAACAAACAA ACAACCCCAC AGTTTAATAT GTGTTACAAC ACACATGCTG	6052
CAACTTTAT GAGTATTTA ATGATATAGA TTATAAAAGG TTGTTTTAA CTTTTAAATG	6112
CTGGGATTAC AGGCATGAGC CACTGTGCCA GGCCTGAACT GTGTTTTAA AAATGCTGA	6172
CCAGCTGTAC ATAGTCTCCT GCAGACTGGC CAAGTCTCAA AGTGGGAACA GGTGTATTAA	6232
GGACTATCCT TTGGTTAAAT TTCCGCAAAT GTTCCTGTGC AAGAATTCTT CTAACTAGAG	6292
TTCTCATTAA TTATATTTAT TTCAG AT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	6343
Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile	
40 45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	6391
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile	
50 55 60	
TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT	6439
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GTAAG ACTGAGCCTT ACTTTGTTT CAATCATGTT AATATAATCA	6496
Ile Ser Phe Lys	
ATATAATTAG AAATATAACA TTATTCTAA TGTTAATATA AGTAATGTAA TTAGAAAAGT	6556
CAAATATCCT CAGACCAACC TTTGTCTAG AACAGAAATA ACAAGAAGCA GAGAACATT	6616
AAAGTGAATA CTTACTAAAA ATTATCAAAC TCTTACCTA TTGTGATAAT GATGGTTTT	6676
CTGAGCCTGT CACAGGGAA GAGGAGATAC AACACTTGT TTATGACCTG CATCTCCTGA	6736
ACAATCAGTC TTTATACAAA TAATAATGTA GAATACATAT GTGAGTTATA CATTAAAGAA	6796
TAACATGTGA CTTTCCAGAA TGAGTTCTGC TATGAAGAAT GAAGCTAATT ATCCTTCTAT	6856
ATTCTACAC CTTTGTAAAT TATGATAATA TTTTAATCCC TAGTTGTTT GTTGTGATC	6916
CTTAGCCTAA GTCTTAGACA CAAGCTTCAG CTTCCAGTTG ATGTATGTTA TTTTAATGT	6976
TAATCTAATT GAATAAAAGT TATGAGATCA GCTGTAAAAG TAATGCTATA ATTATCTCA	7036
AGCCAGGTAT AAAGTATTTG TGGCCTCTAC TTTTCTCA TTATTCTCCA TTATTATTCT	7096
CTATTATTTT TCTCTATTTG CTCCATTATT GTTAGATAAA CCACAAATTAA CTATAGCTAC	7156

AGACTGAGCC	AGTAAGAGTA	GCCAGGGATG	CTTACAAATT	GGCAATGCTT	CAGAGGAGAA	7216
TTCCATGTCA	TGAAGACTCT	TTTGAGTGG	AGATTGCCA	ATAAATATCC	GCTTTCATGC	7276
CCACCCAGTC	CCCACGTAAA	GACAGTTAGG	ATATGACCTT	AGTGAAGGTA	CCAAGGGCAG	7336
ACTTGGTAGG	GAGAAAAAAAG	CCACTCTAAA	ATATAATCCA	AGTAAGAACAA	GTGCATATGC	7396
AACAGATACA	GCCCCCAGAC	AAATCCCTCA	GCTATCTCCC	TCCAACCAGA	GTGCCACCCC	7456
TTCAGGTGAC	AATTGGAGT	CCCCATTCTA	GACCTGACAG	GCAGCTTAGT	TATCAAATAA	7516
GCATAAGAGG	CCTGGGATGG	AAGGGTAGGG	TGGAAAGGGT	TAAGCATGCT	GTTACTGAAC	7576
AACATAATTA	GAAGGGAAAGG	AGATGGCCAA	GCTCAAGCTA	TGTGGATAG	AGGAAAACTC	7636
AGCTGCAGAG	GCAGATTCAAG	AAACTGGGAT	AAGTCCGAAC	CTACAGGTGG	ATTCTTGTG	7696
AGGGAGACTG	GTGAAAATGT	TAAGAAAGATG	GAAATAATGC	TTGGCACTTA	GTAGGAAC TG	7756
GGCAAATCCA	TATTGGGGG	AGCCTGAAGT	TTATTCAATT	TTGATGGCCC	TTTTAAATAA	7816
AAAGAATGTG	GCTGGCGTG	GTGGCTCAC	CCTGTAATCC	CAGCACTTTG	GGAGGCCGAG	7876
GGGGCGGAT	CACCTGAAGT	CAGGAGTTCA	AGACCAGCCT	GACCAACATG	GAGAAACCCC	7936
ATCTCTACTA	AAAATACAAA	ATTAGCTGGG	CGTGGTGGCA	TATGCCTGTA	ATCCCAGCTA	7996
CTCGGGAGGC	TGAGGCAGGA	GAATCTTTG	AACCCGGGAG	GCAGAGGTTG	CGATGAGCCT	8056
AGATCGTGCC	ATTGCACTCC	AGCCTGGCA	ACAAGAGCAA	AACTCGGTCT	CAAAAAAAA	8116
AAAAAAAAAAAG	TGAAATTAAAC	CAAAGGCATT	AGCTTAATAA	TTTAATACTG	TTTTTAAGTA	8176
GGGGGGGGGG	TGGCTGGAAG	AGATCTGTGT	AAATGAGGGA	ATCTGACATT	TAAGCTTCAT	8236
CAGCATCATA	GCAAATCTGC	TTCTGGAAGG	AACTCAATAA	ATATTAGTTG	GAGGGGGGGGA	8296
GAGAGTGAGG	GGTGGACTAG	GACCAGTTT	AGCCCTTGTC	TTTAATCCCT	TTTCCTGCCA	8356
CTAATAAGGA	TCTTAGCAGT	GGTTATAAAA	GTGGCCTAGG	TTCTAGATAA	TAAGATAACAA	8416
CAGGCCAGGC	ACAGTGGCTC	ATGCCTATAA	TCCCAGCACT	TTGGGAGGGC	AAGGCAGTG	8476
TCTCACTTGA	GATCAGGAGT	TCAAGACCAG	CCTGGCCAGC	ATGGCGATAC	TCTGTCTCTA	8536
CTAAAAAAAG	TACAAAAATT	AGCCAGGCAT	GGTGGCATGC	ACCTGTAATC	CCAGCTACTC	8596
GTGAGCCTGA	GGCAGAAGAA	TCGCTTGAAA	CCAGGAGGTG	TAGGCTGCAG	TGAGCTGAGA	8656
TCGCACCACT	GCACCTCCAGC	CTGGCGACA	GAATGAGACT	TTGTCTAAA	AAAAGAAAAA	8716
GATACAACAG	GCTACCCCTTA	TGTGCTCACC	TTTCACTGTT	GATTACTAGC	TATAAAAGTCC	8776
TATAAAAGTTC	TTTGGTCAAG	AACCTTGACA	ACACTAAGAG	GGATTGCTT	TGAGAGGTTA	8836
CTGTCAGAGT	CTGTTTCATA	TATATACATA	TACATGTATA	TATGTATCTA	TATCCAGGCT	8896
TGGCCAGGGT	TCCCTCAGAC	TTTCCAGTGC	ACTTGGGAGA	TGTTAGGTCA	ATATCAACTT	8956
TCCCTGGATT	CAGATTCAAC	CCCTTCTGAT	GTAAAAAAA	AAAAAAA	GAAAGAAATC	9016
CCTTCCCCT	TGGAGCACTC	AAGTTTCACC	AGGTGGGGCT	TTCCAAGTTG	GGGGTTCTCC	9076
AAGGTCAATTG	GGATTGCTTT	CACATCCATT	TGCTATGTAC	CTTCCCTATG	ATGGCTGGGA	9136
GTGGTCAACA	TCAAAACTAG	GAAAGCTACT	GCCCAAGGAT	GTCCTTACCT	CTATTCTGAA	9196
ATGTGCAATA	AGTGTGATTA	AAGAGATTGC	CTGTTCTACC	TATCCACACT	CTCGCTTTCA	9256
ACTGTAACCT	TCTTTTTTTC	TTTTTTCTT	TTTTTTTTT	TTTTTGAAAC	GGAGTCTCGC	9316
TCTGTCGCC	AGGCTAGAGT	GCAGTGGCAC	GATCTCAGCT	CACTGCAAGC	TCTGCCTCCC	9376
GGGTTCACGC	CATTCTCCTG	CCTCACCCCTC	CCAAGCAGCT	GGGACTACAG	GCGCCTGCCA	9436
CCATGCCCAAG	CTAATTTTT	GTATTTTAG	TAGAGACGGG	GTTCACCGT	GTTAGCCAGG	9496
ATGGTCTCGA	TCTCCTGAAC	TTGTGATCCG	CCCGCCTCAG	CCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	9556
ACAGGCAGTG	GCCATCGCAC	CCGGCTCAAC	TGTAACCTTC	TATACTGGTT	CATCTTCCCC	9616
TGTAATGTTA	CTAGAGCTTT	TGAAGTTTG	GCTATGGATT	ATTTCTCATT	TATACATTAG	9676
ATTTCAGATT	AGTTCCAAAT	TGATGCCAC	AGCTTAGGGT	CTCTTCTAA	ATTGTATATT	9736
GTAGACAGCT	GCAGAAGTGG	GTGCCAATAG	GGGAACTAGT	TTATACTTT	ATCAACTTAG	9796
GACCCACACT	TGTTGATAAA	GAACAAAGGT	CAAGAGTTAT	GA C T A G T	TCCACAACTG	9856
ATTGAGAAAGT	TGGAGATAAC	CCCGTGACCT	CTGCCATCCA	GAGTCTTCA	GGCATCTTTG	9916
AAGGATGAAG	AAATGCTATT	TTAATTTGG	AGGTTCTCT	ATCAGTGCTT	AGGATCATGG	9976
GAATCTGTGC	TGCCATGAGG	CCAAAATTAA	GTCCAAAACA	TCTACTGGTT	CCAGGATTAA	10036
CATGGAAGAA	CCTTAGGTGG	TGCCCCATG	TTCTGATCCA	TCCTGCAAAA	TAGACATGCT	10096
GCACTAACAG	GAAAAGTGCA	GGCAGCACTA	CCAGTTGGAT	AACCTGCAAG	ATTATAGTT	10156
CAAGTAATCT	AACCATTCT	CACAAGGCC	TATTCTGTGA	CTGAAACATA	CAAGAATCTG	10216
CATTGGCCT	TCTAAGGCAG	GGCCCAGCCA	AGGAGACCAT	ATTCA GGACA	GAAATTCAAG	10276
ACTACTATGG	AACTGGAGTG	CTTGGCAGGG	AAGACAGAGT	CAAGGACTGC	CAACTGAGCC	10336
AATACAGCAG	GCTTACACAG	GAACCCAGGG	CCTAGCCCTA	CAACAATTAT	TGGGTCTATT	10396
CACTGTAAGT	TTTAATTCA	GGCTCCACTG	AAAGAGTAAG	CTAAGATTCC	TGGCACTTTC	10456
TGTCTCTCTC	ACAGTTGGCT	CAGAAATGAG	AACTGGTCAG	GCCAGGCATG	GTGGCTTACA	10516

CCTGGAAATCC	CAGCACTTTG	GGAGGCCGAA	GTGGGAGGGT	CACTTGAGGC	CAGGAGTTCA	10576
GGACCAGCTT	AGGCAACAAA	GTGAGATACC	CCCTGACCCC	TTCTCTACAA	AAATAAATT	10636
TAAAAATTAG	CCAAATGTGG	TGGTGTATAC	TTACAGTC	AGCTACTCAG	GAGGCTGAGG	10696
CAGGGGGATT	GCTTGAGCCC	AGGAATTCAA	GGCTGCAGTG	AGCTATGATT	TCACCACTGC	10756
ACTTCTGGCT	GGGCAACAGA	GCGAGACCC	GTCTCAAAGC	AAAAAGAAAA	AGAAACTAGA	10816
ACTAGCCTAA	GTTTGTGGGA	GGAGGTCATC	ATCGTCTTA	GCCGTGAATG	GTTATTATAG	10876
AGGACAGAAA	TTGACATTAG	CCCAAAAAGC	TTGTGGTCTT	TGCTGGAACT	CTACTTAATC	10936
TTGAGCAAAT	GTGGACACCA	CTCAATGGGA	GAGGAGAGAA	GTAAGCTGTT	TGATGTATAG	10996
GGGAAAAC	GAGGCCTGG	ACTGAATATG	CATCCCATGA	CAGGGAGAAT	AGGAGATT	11056
GAGTTAAGAA	GGAGAGGAGG	TCAGTACTGC	TGTTCAGAGA	TTTTTTTAT	GTAACTCTTG	11116
AGAACCAAAA	CTACTTTGT	TCTGTTGGT	AATATACTTC	AAAACAAACT	TCATATATTC	11176
AAATTGTTCA	TGTCCTGAAA	TAATTAGGTA	ATGTTTTT	CTCTATAG	GAA ATG AAT	11233
					Glu Met Asn	
					85	
CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG						11281
Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Glu						
90 95 100						
AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA						11329
Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser						
105 110 115						
TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA						11377
Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys						
120 125 130 135						
CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC						11425
Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe						
140 145 150						
ACT GTT CAA AAC GAA GAC TAGCTATTAA AATTCATGC C						11464
Thr Val Gln Asn Glu Asp						
155						

(18) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 471 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: double
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: mouse
 - (G) CELL TYPE: liver
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: mat peptide
 - (B) LOCATION: 1..471
 - (C) IDENTIFICATION METHOD: S
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

SEQ ID NO:18:

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT						48
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn						
1 5 10 15						
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG						96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met						
20 25 30						
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA						144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile						
35 40 45						

TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT	192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser	
50 55 60	
GTG AAG GAT AGT AAA ATG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT	240
Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile	
65 70 75 80	
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT	288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser	
85 90 95	
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG	336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu	
100 105 110	
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA	384
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu	
115 120 125	
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT	432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp	
130 135 140	
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT	471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser	
145 150 155	

(19) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

- (i)SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A)LENGTH: 9 amino acids
 - (B)TYPE: amino acid
 - (D)TOPOLOGY: linear
- (ii)MOLECULE TYPE: peptide
- (v)FRAGMENT TYPE: N-terminal fragment
- (xi)SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

SEQ ID NO:19:

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr
1 5

[Brief Description of the Accompanying Drawings]

FIG. 1 shows the structure of the recombinant DNA pKGFHH2.

FIG. 2 shows the structure of the recombinant DNA pCSHIGIF/MUT35.

FIG. 3 shows the structure of the recombinant DNA pCSHIGIF/MUT42.

FIG. 4 shows the structure of the recombinant DNA pBGHuGF.

FIG. 5 shows the structure of the recombinant DNA

pKGFMH2.

[Explanation of the Symbols]

KGFHH2 cDNA: A cDNA encoding the IL-18 according to the present invention.

IGIF/MUT35: A DNA encoding the IL-18 according to the present invention.

IGIF/MUT42: A DNA encoding the IL-18 according to the present invention.

HuIGIF: A chromosomal DNA encoding the IL-18 according to the present invention.

KGFMH2 cDNA: A cDNA encoding the IL-18 according to the present invention.

5S: A gene for 5S ribosomal RNA.

Ptac: A tac promoter.

rrnBT1T2: A termination region of a ribosomal RNA operon.

AmpR: An ampicillin resistant gene.

pBR322ori: A replication origin of *Escherichia coli*.

CMV: A cytomegalovirus promoter.

IFNss: A nucleotide sequence encoding a signal peptide for subtype α 2b of human interferon- α .

[Document Name] Abstract

[Summary]

[Object] The object of the present invention is to provide a novel and effective osteoclastgenic inhibitory agent.

[Means to Attain the Object] The object of the present invention is resolved by an osteoclastgenic inhibitory agent which comprises an interleukin-18 and/or its functional equivalent.

[Selected Figure] None

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1997年 2月 25日

出願番号
Application Number: 平成 9年特許願第055468号

出願人
Applicant(s): 株式会社林原生物化学研究所

1998年 3月 20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光

出証番号 出証特平10-3016074

【書類名】 特許願

【整理番号】 10053901

【提出日】 平成 9年 2月25日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 A61K 38/19
C07K 14/52
C12N 15/19

【発明の名称】 破骨細胞形成阻害剤

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 デパートメント・オブ・メディシン、ザ・ユニバーシティー・オブ・メルボルン・アンド・セイント・ビンセンツ・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ、41 ビクトリア・パレード・フィッツロイ 3065、オーストラリア連邦

【氏名】 マシュー・トッド・ギャルスピー

【発明者】

【住所又は居所】 デパートメント・オブ・メディシン、ザ・ユニバーシティー・オブ・メルボルン・アンド・セイント・ビンセンツ・インスティテュート・オブ・メディカル・リサーチ、41 ビクトリア・パレード・フィッツロイ 3065、オーストラリア連邦

【氏名】 ニコル・ジョイ・ホーワッド

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市明原3丁目16番7号

【氏名】 宇田川 信之

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

【氏名】 栗本 雅司

【特許出願人】

【識別番号】 000155908
【郵便番号】 700
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所
【代表者】 林原 健

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 破骨細胞形成阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 インターロイキン-18 又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 2】 インターロイキン-18 が部分アミノ酸配列として配列表における配列番号 1、2 及び 3 に示すアミノ酸配列を有している請求項 1 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 3】 インターロイキン-18 が部分アミノ酸配列として配列表における配列番号 4 及び 5 に示すアミノ酸配列を有している請求項 1 又は 2 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 4】 インターロイキン-18 が配列表における配列番号 6 に示すアミノ酸配列を有している請求項 1、2 又は 3 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 5】 インターロイキン-18 がヒト起源である請求項 1、2、3 又は 4 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 6】 インターロイキン-18 が配列表における配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有している請求項 1、2 又は 3 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 7】 破骨細胞関連疾患剤としての請求項 1、2、3、4、5 又は 6 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 8】 安定剤として、蛋白質、緩衝剤又は糖質をさらに含んでなる請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 に記載の破骨細胞形成阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、インターロイキン-18（以下、「IL-18」と略記する。）又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

健常な生体においては、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収はバラ

ンスよく保たれ、その結果、骨組織は基本的形状を変えることなく常に新生骨と置換されて健常な状態が保たれている。また、このバランスは、血中のカルシウム濃度を一定に保つなど生体の恒常性維持のためにも重要な役割を果たしている。一方、このバランスが崩れた場合、特に骨吸収量が骨形成量を上回るような場合には、骨関連の疾患のみならずその他の種々の疾患が惹き起こされることとなる。したがって、生体における一連の骨吸収機構の解明、とりわけ、破骨細胞の形成機構の解明は、科学的に意義があるばかりではなく、臨床的にも極めて意義のあることであり、多大な注目を集めている。

【0003】

しかしながら、破骨細胞の形成の機構は、例えば、促進因子としてインターロイキン-1や阻害因子としてインターロイキン-4等が確認されているにも拘わらず、未だ完全に解明されたと言える状況にはない。これは、生体における破骨細胞の形成も、他の生体内での種々の現象と同様に、数多くの促進因子や阻害因子が複雑に且つ密接に関わり合って制御されているためと考えられている。これらのことから、科学的見地のみならず、臨床的見地からも、効果ある破骨細胞形成阻害剤の確立が希求されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、効果ある、新規な破骨細胞形成阻害剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

【0006】

IL-1 β は免疫系における情報伝達物質であるサイトカインの一種である。本サイトカインは、その発見当初には、特開平8-27189号公報、特開平8-193098号公報及びハルキ・オカムラら『ネイチャー』、第378巻、第6、552号、88乃至91頁(1995年)に見られるように、インターフェロン- γ 誘導因子として記載されていたが、その後、シンペイ・ウシオら『ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー』、第156巻、4、274乃至4、279頁

(1996年)における提案にしたがって、IL-18と呼称されるようになつた。IL-18は、免疫担当細胞において生理活性物質として有用なインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と略記する。）や顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、「GM-CSF」と略記する。）の産生を誘導する性質、さらには、キラー細胞の細胞障害性を増強したり、キラー細胞の生成を誘導する性質を兼備している。

【0007】

一方、本発明者らは、上記課題を解決すべく研究を進める過程で、イン・ビトロで前駆破骨細胞からの破骨細胞の形成を阻害する能力のある、マウス骨髓由来のある種のストローマ細胞株において、特定の遺伝子が特異的に多量に発現していることを見出した。そしてさらに詳細に解析したところ、当該遺伝子は、配列表における配列番号7に示すアミノ酸配列を有するIL-18をコードするものであることが判明した。これら知見に基づき、さらに銳意研究したところ、当該アミノ酸配列を有するIL-18及びその機能性誘導体が破骨細胞の形成を顕著に阻害すること及び、この阻害は主として当該IL-18により誘導され產生されたGM-CSFの作用によっていることが判明した。この発明は、以上の独自の知見に基づき完成されたものである。

【0008】

すなわちこの発明は、上記の課題をIL-18又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤により解決するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】

この発明の破骨細胞形成阻害剤はIL-18又はその機能性誘導体を含んでなるものである。ここでいうIL-18とは、IL-18としての上述の如き性質を有するポリペプチドすべてを包含するものであり、その出所・由来は問わない。この発明で用いるIL-18としては、例えば、中間部の部分アミノ酸配列として配列表における配列番号1、2及び3と、さらに配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有し、全体としては配列番号6又は7に示すアミノ酸配列を有しているIL-18を挙げることができる。また、本明細書でいう機能性誘導体とは

、上述したような IL-18 の性質のうち、破骨細胞の形成を阻害する性質を実質的に失わない範囲で、そのアミノ酸配列におけるアミノ酸の 1 個又は 2 個以上を他のアミノ酸で置換したもの、これらのアミノ酸配列における N 末端及び／又は C 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸を付加したもの、これらアミノ酸配列における中間部に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸を挿入したもの、これらアミノ酸配列における N 末端及び／又は C 末端のアミノ酸が 1 個又は 2 個以上欠失したもの、及び、これらアミノ酸配列における中間部のアミノ酸が 1 個又は 2 個以上欠失したものを意味する。斯かる機能性誘導体としては、例えば、同じ出願人による特願平 9-20906 号の明細書に、 IL-18 としての性質を実質的に保持しつつその安定性を向上せしめた機能性誘導体のアミノ酸配列について詳述されている。さらにまた、本明細書でいう機能性誘導体とは、以上のような IL-18 又はその機能性誘導体に糖鎖の付加されてなるポリペプチドをも包含する。以上のような IL-18 又はその機能性誘導体（以下、特に断らない限り IL-18 とその機能性誘導体の両者を含めて「当該 IL-18」と略記する。）は、細胞培養法等により天然の給源から分離したものであっても、組換え DNA 技術やペプチド合成法により人工的に合成したものであっても構わない。

【0010】

経済的見地に立てば、組換え DNA 技術による方法が有利であり、斯かる方法においては、通常、微生物又は動植物由来の適宜宿主に当該 IL-18 をコードする DNA を導入して形質転換体となし、これを常法により培養後、培養物をサイトカインを精製するための斯界における慣用の方法により精製して当該 IL-18 を得る。ここで用いられる DNA は、当該 IL-18 をコードする DNA を含んでなるものであればいずれでもよく、破骨細胞形成阻害剤の使用の目的や適用する方法に応じて適宜の配列の DNA を選択することができる。例えば、同じ出願人による特開平 8-193098 号公報、特開平 8-231598 号公報及び特開平 8-27189 号公報には、マウス及びヒト由来の IL-18 をコードする cDNA を含む DNA を導入した形質転換体微生物を培養して得る当該 IL-18 の製造方法が、また、同じ出願人による特願平 8-185305 号の明細書には、ヒト由来の IL-18 をコードする、染色体 DNA を含む DNA を導入

した形質転換体動物細胞を培養して得る当該IL-18の製造方法が詳述されている。さらに、同じ出願人による特願平9-20906号の明細書には、ヒトIL-18機能性誘導体をコードするDNAを含むDNAを導入した形質転換体動物細胞を培養して得る当該IL-18の製造方法が詳述されている。

【0011】

以上のような組換えDNA技術は、上述のように経済性において有利である反面、斯かる方法により得られる当該IL-18は、用いる宿主やDNAの配列によっては、本来生体内で產生され機能するIL-18とは理化学的性質に若干の相違の生じる場合もある。しかるに、同じ出願人による特願平8-67434号の明細書には、天然の給源として培養株化されたヒト細胞を用いたIL-18の製造方法が、また、同じ出願人による特願平8-213267号の明細書には、インターロイキン-1 β 変換酵素を用いたIL-18の製造方法が詳述されており、これらの方法により得られるIL-18は、生体内で产生され機能するIL-18と理化学的性質が実質的に同一か又は、極めて同一に近いと考えられるため、产生量としてはやや低いものの、例えば、ヒトを含む温血動物への投与を前提とする医薬品等として用いる場合には副作用の低さの点で有利である。なお、同じ特許出願人による特開平8-231598号公報に開示された、当該IL-18に対して特異的なモノクローナル抗体を用いた精製方法を適用するときには、高純度の当該IL-18を最小限のコストと労力で得ることができる。

【0012】

この発明の破骨細胞形成阻害剤は、斯くして得られる当該IL-18を含んでなるものであり、イン・ビトロ、イン・ビボを問わず、破骨細胞の形成を阻害するために用いられるすべての形態を包含する。例えば、破骨細胞の形成を阻害して、所望の細胞の維持、増殖及び／又は分化を良好ならしめる、動物細胞等の細胞培養用の培地成分として、骨関連の疾患剤のスクリーニング用キットの構成物として、骨吸収調整剤として、また、破骨細胞関連疾患剤として有利に用いることができる。ここでいう骨吸収調整剤とは、生体内での破骨細胞の形成を阻害することにより骨吸収を正常な域に調整して、比較的軽微な関節痛などの体調不良を改善する薬剤及び健康食品等を包含する。また、ここでいう破骨細胞関連疾患

剤とは、生体内での破骨細胞の過剰な形成及び／又は機能に伴うすべての疾患を予防及び／又は治療するための薬剤を包含するものであり、対象疾患としては、例えば、高カルシウム血症、破骨細胞腫、ペーチェット病、骨肉腫、関節症、慢性関節リウマチ、変形性骨炎、原発性甲状腺機能亢進症、骨減少症、骨粗鬆症等を挙げることができる。剤型ならびに使用対象にもよるが、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、通常、液状、ペースト状又は固状に調製され、当該 I L - 1 8 を 0. 0 0 0 0 0 2 乃至 1 0 0 % (w/w) 、望ましくは、 0. 0 0 0 2 乃至 0. 5 % (w/w) 含んでなる。

【0013】

この発明の破骨細胞形成阻害剤は当該 I L - 1 8 単独の形態はもとより、それ以外の、例えば、担体、賦形剤、希釈剤、免疫助成剤、抗生物質、安定剤として血清アルブミンやゼラチンなどの蛋白質のほか、グルコース、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、トレハロース、スクロース、イソマルトース、ラクトース、パノース、エルロース、パラチノース、ラクトスクロース、ラフィノース、フラクトオリゴ、ガラクトオリゴ糖、レンチナン、デキストリン及びプルラン等の糖類やソルビトール、マルチトール、ラクチトール及びマルトトリイトール等の糖アルコール類を始めとする糖質、磷酸塩又はクエン酸塩を主体とする緩衝剤、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール及び還元型グルタチオン等の還元剤、さらには、必要に応じて、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、インターロイキン2、インターロイキン3、インターロイキン6、インターロイキン12、TNF- α 、TNF- β 、GM-CSF、エストロゲン、プロジェステロン、酢酸クロルマジノン、カルシトニン、ソマトカイン、ソマトメジン、インスリン様成長因子、イプリフラボン、パラサイロイドホルモン、ノルエチステロン、ブスルファン、アンシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、テトラヒドロフリルフルオロウラシル、メトトレキセート、ビタミンD₂、活性型ビタミンD、クレスチン、L-アスパラギナーゼ及びピシバニールを始めとする他の生理活性物質や、乳酸カルシウム、塩化カルシウム、磷酸水素カルシウム、L-アスパラギン酸カルシウムを始めとするカルシウム塩の1種又は2種以上との組成物としての形態をも包含する。なお、

この発明の破骨細胞形成阻害剤を、ヒトを含む温血動物に投与する、例えば、破骨細胞関連疾患剤として用いる場合には、上記のうちから生理的に許容される物質を適宜に選んで組成物とするのが望ましい。

【0014】

さらに、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、ヒトを含む温血動物に投与して使用する際の、投薬単位形態の薬剤をも包含し、その投薬単位形態の薬剤とは、当該IL-18を、例えば、1回当たりの用量又はその整数倍（4倍まで）若しくはその約数（1/40まで）に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に分離した一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬形態の薬剤としては、注射剤、液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、点眼剤、点鼻剤、坐剤などが挙げられる。

【0015】

この発明の、破骨細胞形成阻害剤としての破骨細胞形成阻害剤は、経口的に投与しても非経口的に投与しても、いずれの場合にも、破骨細胞関連疾患の治療・予防に効果を発揮する。疾患の種類や症状にも依るが、具体的には、患者の症状や投与後の経過を観察しながら、成人当たり約0.5μg乃至100mg/回、望ましくは、約2μg乃至10mg/回の当該IL-18を2乃至6回/日又は2乃至10回/週の用量で1日乃至1年間に亘って経口投与するか、皮内、皮下、筋肉内又は静脈内に非経口投与すればよい。

【0016】

次に実験例を示し、当該IL-18の調製及び当該IL-18の理化学的性質並びに生物作用について説明する。

【0017】

【実験例1】

<ヒトIL-18の調製>

同じ出願人による特開平8-231598号公報に記載された方法にしたがって、ヒトIL-18をコードするcDNAが連結された自律複製可能な組換えDNA『pKGFHH2』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図1に示すように、この組換えDNAにおいては、配列表における配列番号8に示す

塩基配列を含むKG FHH2 cDNAがTacプロモータの下流に連結されていた。また、この組換えDNA pKG FHH2は、配列表における配列番号1、2、3、4及び5に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を全て含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号8に示した塩基配列における第46乃至63番目、第88乃至105番目、第400乃至420番目、第151乃至165番目及び第214乃至228番目の塩基によりコードされていた。

【0018】

さらに同じく特開平8-231598号公報に記載された方法にしたがって、この組換えDNA pKG FHH2を大腸菌Y1090株(ATCC 37197)に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製したところ、純度95%以上の精製ヒトIL-18が、培養液1L当たり約25mgの収量で得られた。この精製ヒトIL-18を、同じ出願人による特開平8-193098号公報に記載された方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18の濃度に依存したIFN- γ の產生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞であるリンパ球におけるIFN- γ の產生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,500±3,000ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示す一方、常法にしたがいクロマトフォーカシングすると、4.9±1.0に等電点を示した。また、そのN末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号8に併記したアミノ酸配列におけるN末端にメチオニンが結合した配列番号9に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0019】

【実験例2】

<ヒトIL-18の調製>

同じ出願人による特願平8-67434号の明細書に記載の方法にしたがって、生後間もないハムスターの新生児の背部皮下にヒト急性单球性白血病由来の骨髓单球系細胞株の一種であるTHP-1細胞(ATCC TIB202)を移植し、3週間飼育した。そして、皮下に生じた腫瘍塊(約15g/匹)を摘出し、分散させた後、細胞を破碎し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18をハムスター1匹当たり約50ngの収量を得た。

【0020】

この精製ヒトIL-18を、同じく特願平8-67434号の明細書に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18の濃度に依存したIFN- γ の產生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞であるリンパ球におけるIFN- γ の产生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて、還元剤として2%(w/v)ジチオトレイトル存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。さらに同じく特願平8-67434号の明細書にその方法が記載されているペプチドマップにしたがって、この精製ヒトIL-18をシグマ製クロストリパイン剤処理することにより得られるポリペプチド断片を、トーソー製『ODS-120T』のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに供して分取し、個々のペプチド断片のアミノ酸配列をN末端側から分析したところ、配列表における配列番号10、11、12及び13に示すアミノ酸配列が得られた。これらアミノ酸配列は、それぞれ、配列表における配列番号6に示したアミノ酸配列における148乃至157番目、第1乃至13番目、第45乃至58番目及び第80乃至96番目の配列と完全に一致した。以上の結果は、こ

の実験例2の方法で得たIL-18が配列表における配列番号6に示すアミノ酸配列を有するものであり、その配列番号1、2、3、4及び5に示した部分アミノ酸配列を全て有していることを示している。

【0021】

【実験例3】

<機能性誘導体の調製>

同じ出願人による特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列における第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに置換したヒトIL-18機能性誘導体をコードするDNAが連結された、自律複製可能な組換えDNA『pCSHIGIF/MUT35』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図2に示すように、この組換えDNAにおいては、カーステン・ヘンコラが『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第185巻、227乃至260頁(1985年)に報告しているヒトインターフェロン- α におけるサブタイプ α 2bのシグナルペプチドをコードする塩基配列の下流に、同じ読み方で、配列表における配列番号14に示した塩基配列を有するDNA『IGIF/MUT35』が連結され、さらにその下流に蛋白質合成の終始コドンが存在していた。このDNAがコードするアミノ酸配列は、配列表における配列番号14に併記したことと、配列表における配列番号6におけるアミノ酸配列の第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに置換してなるものであった。また、このDNAは、配列表における配列番号1、2、3及び4に示したすべてのアミノ酸配列と、配列番号5に示したアミノ酸配列の第5のアミノ酸のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号14に示した塩基配列における第46乃至63番目、第88乃至105番目、第400乃至420番目、第151乃至165番目及び第214乃至228番目の塩基によりコードされていた。

【0022】

さらに同じ出願人による特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、この組換えDNA pCSHIGIF/MUT35を、アフリカミドリザルの腎臓に由来する株化細胞の一種であるCOS-1細胞(ATCC CRL 1650)に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18機能性誘導体を培養培地1ml当たり約40ngの收量で得た。そしてさらに、特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、この精製ヒトIL-18機能性誘導体を、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18機能性誘導体の各種濃度の存在下でヒト急性骨髓性白血病に由来する株化細胞の一種であるKG-1細胞(ATCC CCL 246)を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18機能性誘導体の濃度に依存したIFN- γ の产生が認められ、この精製IL-18機能性誘導体が、免疫担当細胞としてのKG-1細胞におけるIFN- γ の产生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて、還元剤として2%(w/v)ジチオトレイトル存在下でSDS-ポリアクリラミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号14に併記したアミノ酸配列におけるN末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する、配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0023】

【実験例4】

<機能性誘導体の調製>

同じ出願人による特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、配列表の配列番号6に示すアミノ酸配列における第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに、第127番目のシステインをセリンに置換したヒトIL-18機能性誘導

体をコードするDNAが連結された、自律複製可能な組換えDNA『pCSHIGIF/MUT42』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図3に示すように、この組換えDNAにおいては、カーステン・ヘンコラが『ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー』、第185巻、227乃至260頁（1985年）に報告しているヒトインターフェロン- α におけるサブタイプ α 2bのシグナルペプチドをコードする塩基配列の下流に、同じ読み枠で、配列表における配列番号16に示した塩基配列を有するDNA『IGIF/MUT42』が連結され、さらにその下流に蛋白質合成の終始コドンが存在していた。このDNAがコードするアミノ酸配列は、配列表における配列番号16に併記したごく、その配列番号6におけるアミノ酸配列の第38番目のシステインをセリンに、第68番目のシステインをセリンに、第76番目のシステインをアラニンに、第127番目のシステインをセリンに置換してなるものであった。また、このDNAは、配列表における配列番号1、2、3及び4に示したすべてのアミノ酸配列と、配列表における配列番号5に示したアミノ酸配列の第5のアミノ酸のシステインがアラニンに置換されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、配列表における配列番号16に示した塩基配列における第46乃至63番目、第88乃至105番目、第400乃至420番目、第151乃至165番目及び第214乃至228番目の塩基によりコードされていた。

【0024】

さらに同じ出願人による特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、この組換えDNA pCSHIGIF/MUT42を、COS-1細胞に導入し、培養し、產生されたポリペプチドをイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18機能性誘導体を培養培地1ml当たり約20ngの収量で得た。そしてさらに、特願平9-20906号の明細書に記載の方法にしたがって、この精製ヒトIL-18機能性誘導体を、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18機能性誘導体の各種濃度の存在下でKG-1細胞を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18機能性誘導体の濃度に依存したIFN- γ の產生が

認められ、この精製IL-18機能性誘導体が、免疫担当細胞としてのKG-1細胞におけるIFN- γ の産生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁（1970年）に報告した方法に準じて、還元剤として2%（w/v）ジチオトレイトル存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端を常法にしたがいパーキン・エルマー製のプロテイン・シーケンサー『473A型』を用いて分析したところ、配列表の配列番号16に併記したアミノ酸配列におけるN末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する、配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列を有していることが確認された。

【0025】

【実験例5】

<ヒトIL-18の調製>

同じ出願人による特願平8-185305号の明細書に記載の方法にしたがって、ヒトIL-18をコードする染色体DNAが連結された、自律複製可能な組換えDNA『pBGHuGF』を調製した。ジデオキシ法により解析したところ、図4に示すようにこの組換えDNAにおいては、ヒトIL-18をコードする染色体DNAである、配列表における配列番号17に示す塩基配列のDNA『HuIGIF』が、制限酵素Hind IIIによる切断部位の下流に連結されていた。配列表における配列番号17に示すように、この染色体DNA『HuIGIF』は11,464bpよりなり、この配列の5'末端より第83乃至1,453番目、第1,466乃至4,848番目、第4,984乃至6,317番目及び第6,452乃至11,224番目に位置する4個のイントロンによりエクソンが分断されている構成であった。これらイントロンを除いた配列のうち、5'末端より第3乃至11443番目の塩基はヒトIL-18前駆体をコードする部分であり、さらにこの内、第4866乃至4983番目の塩基は活性あるヒトIL-18をコードする部分であった。また、このDNAは、配列表における配列番号1、2、3、4及び5に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を全て

含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号17に示す塩基配列における第4, 911乃至4, 928番目、第4, 953乃至4, 970番目、第11, 372乃至11, 392番目、第6, 350乃至6, 364番目及び第6, 413乃至6, 427番目の塩基によりコードされていた。

【0026】

さらに同じく特願平8-185305号の明細書に記載の方法にしたがって、この組換えDNA pBGHuGFを、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞由来の株化細胞であるCHO-K1細胞(ATCC CCL61)に導入し、培養し、培養上清にTHP-1細胞を培養して得た細胞破碎物の上清を作用させて、生成したポリペプチドをイムノアフィニティクロマトグラフィーにより精製して、精製ヒトIL-18を培養物11当たり約15mgの収量を得た。そしてさらに、この精製ヒトIL-18を、同じく特願平8-185305号の明細書に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製ヒトIL-18の各種濃度の存在下で常法により健常人より採取したヒトリンパ球を培養すると、存在させた精製ヒトIL-18の濃度に依存したIFN- γ の産生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞であるリンパ球におけるIFN- γ の産生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁(1970年)に報告した方法に準じて、還元剤として2%(w/v)ジチオトレイトール存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量18,000乃至19,500ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端は、配列表の配列番号17に併記したアミノ酸配列のうち、活性あるIL-18のN末端部分のアミノ酸配列と完全に一致する配列表における配列番号15に示すアミノ酸配列を有していた。

【0027】

【実験例6】

〈マウスIL-18の調製〉

0. 5 ml 容反応管に 25 mM 塩化マグネシウムを 8 μ l、10 \times PCR 緩衝液を 10 μ l、25 mM dNTP ミックスを 1 μ l、2.5 単位/ μ l アンプリタック DNA ポリメラーゼを 1 μ l、特開平 8-27189 号公報に記載された方法にしたがってファージ DNA クローンから調製した、配列表における配列番号 18 に示す塩基配列を有し、配列番号 7 に示すアミノ酸配列のマウス IL-18 をコードする DNA を含む組換え DNA を 1 ng、配列表の配列番号 7 における N 末端及び C 末端付近のアミノ酸配列に基づき化学合成した 5' - ATAG AATTCAAATGAACCTTGGCCGACTTCAGTG - 3' 及び 5' - ATAAAGCTTCTAACCTTGATGTAAGTT - 3' で表わされる塩基配列のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの適量を加え、滅菌蒸留水で 100 μ l とした。常法により、この混合物を 94°C で 1 分間、43°C で 1 分間、72°C で 1 分間、この順序でインキュベートするサイクルを 3 回繰返した後、さらに、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間、この順序でインキュベートするサイクルを 40 回繰返して PCR 反応させた。

【0028】

この PCR 産物とストラタジーン製プラスミドベクター『pCR-Script SK (+)』を常法にしたがって DNA リガーゼにより連結して組換え DNA とし、これをコンピテントセル法によりストラタジーン製大腸菌株『XL-1 Blue MRF' Kan』に導入して形質転換した。形質転換体を 50 μ g/ml アンピシリンを含む L-ブロス培地 (pH 7.2) に接種し、37°C で 18 時間振盪培養した後、培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS 法を適用して組換え DNA を単離した。この組換え DNA の一部をとり、ジデオキシ法により分析したところ、配列表の配列番号 18 に示す塩基配列における 5' 末端及び 3' 末端にそれぞれ Eco RI 切断部位及び Hind III 切断部位を含み、さらに、その配列番号 18 に併記したアミノ酸配列における N 末端及び C 末端のそれぞれ直前及び直後に対応する部位にポリペプチド合成開始のためのメチオニンコドン及びポリペプチド合成終止のための TAG コドンを有する DNA を含んでいた。また、この組換え DNA は、配列表における配列番号 1、2、3、4 及び 5 に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を

全て含むものであった。すなわち、これらアミノ酸配列はそれぞれ、その配列番号18に示した塩基配列における第46乃至63番目、第85乃至102番目、第394乃至414番目、第148乃至162番目及び第211乃至225番目の塩基によりコードされていた。

【0029】

そこで、常法にしたがって残りの組換えDNAを制限酵素Eco RI及びHind IIIで切断後、宝酒造製DNAライゲーションキット『DNAライゲーション・キット・バージョン2』を使用して、得られたEco RI-Hind III DNA断片0.1μgと予め同じ制限酵素で切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pKK223-3』10ngを16℃で30分間反応させて連結して複製可能な組換えDNA『pGFMH2』を得た。コンピテントセル法により、この組換えDNA pGFMH2で大腸菌Y1090株(ATCC37197)を形質転換し、得られた形質転換体『KGFMH2』を50μg/mlアンピシリンを含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37℃で18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、その一部に通常のSDS-アルカリ法を適用して組換えDNA pGFMH2を抽出した。ジデオキシ法により分析したところ、図5に示すように、組換えDNA pGFMH2においては、配列表における配列番号18に示す塩基配列を含むKGFMH2 cDNAがTacプロモータの下流に連結されていた。

【0030】

オートクレーブにより滅菌したL-ブロス培地(pH7.2)に、アンピシリンを濃度50μg/mlとなるように添加し、37℃に冷却後、形質転換体KGFMH2を接種し、振盪下、37℃で18時間種培養した。201容ジャーファーメンタに新鮮な同一培地を181とり、同様に滅菌し、アンピシリンを添加し、37℃に冷却後、上記で得た種培養物を1%(v/v)接種し、37℃で8時間通気攪拌培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、150mM塩化ナトリウム、16mM磷酸水素二ナトリウム及び4mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.3)に浮遊させ、超音波破碎後、遠心分離により菌体破碎物を除去し、上清約21を採取した。

【0031】

得られた上清約21に硫酸アンモニウムを含む10 mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが40%飽和になるように加え、沈殿物を遠心分離にて除去後、さらに上清に硫酸アンモニウムが85%飽和になるまで加え、4°Cで18時間放置後、約8,000 rpmで30分間遠心分離して沈澱を採取した。次にこの沈澱を1.5M硫酸アンモニウムを含む10 mM磷酸緩衝液(pH6.6)に溶解して約1,300 mlとし、濾過後、予め新鮮な同一緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロース CL-4B』約800 mlのカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1.5Mから0Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、10 mM磷酸緩衝液(pH6.6)をSV1.5で通液した。硫酸アンモニウム濃度が1M付近のときに溶出された画分を採取し、膜濃縮し、10 mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4°Cで18時間透析後、予め10 mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE-5PW』約55 mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.5Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに10 mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV5.5で通液し、塩化ナトリウム濃度が0.2M付近で溶出された画分を採取した。その後、採取した溶出液を上記と同様に濃縮して約9 mlとし、PBSに対して4°Cで18時間透析後、予め新鮮なPBSで平衡化させておいたファルマシア製『スーパー・デックス75』のカラムに負荷した。さらにカラムに新鮮なPBSを通液してIFN- γ 誘導能ある画分を採取し、膜濃縮して精製マウスIL-18を得た。この精製マウスIL-18の収量は、培養液1l当たり約350 μ gであった。

【0032】

この精製マウスIL-18を、特開平8-27189号公報に記載の方法にしたがって、次に示すように分析してその生物作用と理化学的性質を確認した。すなわち、この精製マウスIL-18の各種濃度の存在下で常法により採取したマウス脾細胞を培養すると、存在させた精製マウスIL-18の濃度に依存したIFN- γ の産生が認められ、この精製IL-18が、免疫担当細胞である脾細胞におけるIFN- γ の産生を誘導する生物作用を有することが確認された。ユ-

・ケー・レムリが『ネイチャー』、第272巻、680乃至685頁（1970年）に報告した方法に準じて、非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、分子量19,000±5,000ダルトンに相当する位置にIFN- γ 誘導能ある主たるバンドを示した。また、そのN末端は、配列表の配列番号18に併記したアミノ酸配列におけるN末端部に相当する、配列番号19に示すアミノ酸配列を有していた。

【0033】

次に実験例7を示してこの発明で用いるIL-18の生物作用についてさらに詳細に説明し、実験例8を示してその毒性について説明する。

【0034】

【実験例7】

〈生物作用〉

【0035】

【実験例7-1】

〈GM-CSFの產生の誘導〉

ヘパリン加注射器により健常者から血液を採取し、血清無含有のRPMI1640培地（pH7.4）により2倍希釈した。血液をフィコール上に重層し、遠心分離して採取したリンパ球を10%（v/v）ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地（pH7.4）により洗浄した後、新鮮な同一培地に細胞密度 1×10^6 個/mlになるように浮遊させ、12ウェルプレートに2ml/ウェルずつ分注した。

【0036】

別途、実験例1の方法により得たIL-18を10%（v/v）ウシ胎児血清を補足したRPMI1640培地（pH7.4）により濃度 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製して、上記プレートに20乃至 $200 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ分注し、 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ のコンカナバリンAを含む新鮮な上記と同一培地を $10 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ ずつ加えた後、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで48時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、通常の酵素免疫測定法によりGM-CSF含量を測定した。同時に、IL-18のみを省略した系を設け、上記と同

様に処置して対照とした。結果を表1に示す。

【0037】

【表1】

IL-18濃度*	GM-CSF産生量 (pg/ml)
(nM)	
0	510
0.7	2150
2.8	3050
5.6	3950

註) * : 濃度2.5μg/mlのコンカナバリンA共存下でIL-18を添加した。

【0038】

表1の結果は、補因子としてコンカナバリンAの共存下でIL-18を作用させると、免疫担当細胞としてのリンパ球がIL-18の濃度に依存してGM-CSFを産生したことを示している。なお、実験例2乃至5の方法で得たIL-18乃至その機能性誘導体をそれぞれ別個に同様にこの操作に供した場合にも、いずれも同じくGM-CSFの産生を誘導することが確認された。一方、実験例6の方法で得たIL-18については、実験例7-1で用いたヒトの血液より採取したリンパ球に代えて常法によりマウスより採取した脾細胞を用いたこと以外は実験例7-1に準じて試験したところ、同じくGM-CSFの産生を誘導することが確認された。

【0039】

【実験例7-2】

〈破骨細胞形成の阻害〉

【0040】

【実験例7-2(a)】

ティー・ジー・マーチンら、『ジャーナル・オブ・セルラー・バイオケミス

トリー』、第56巻(1994年)、357乃至366頁等にも記載されているように、一般に破骨細胞の前駆細胞が分化し破骨細胞が形成されるためには、骨髓の造血幹細胞に由来する前駆破骨細胞が骨芽細胞や骨髓ストローマ細胞と接触することが必要条件であるとされている。また、ジー・ディー・ルードマン、『エンドクリン・レビュー』、第17巻(1996年)、第308乃至332頁等に記載されているように、破骨細胞の特徴は、多核であること、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(以下、「T R A P」と略記する。)活性を有すこと、カルシトニン・レセプターを有すこと等であると一般に認識されている。一方、エヌ・ウダガワら、『ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン』、第182巻(1995年)、1461乃至1468頁に記載の骨芽細胞と骨髓細胞の共培養系においては、例えば、 1α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃、プロスタグラランジンE₂、副腎皮質ホルモン、インターロイキン1、インターロイキン6又はインターロイキン11のうちのいずれかの因子に応答して破骨細胞様の細胞(以下、「O C L」と略記することもある。)の形成が認められる。ここで形成されるO C Lは生体内の破骨細胞の特徴を備えている。したがってこの共培養系は生体内における破骨細胞の形成の過程をイン・ビトロでよく再現するものであり、この系を用いることにより破骨細胞の形成やそれに対する阻害剤についての実験を行うことができる。

【0041】

この共培養系を用いて、当該IL-18の破骨細胞形成の阻害作用を調べた。骨芽細胞は、常法に従い新生マウスの頭蓋冠を0.1%(w/v)コラゲナーゼ(オーストラリア国、ワシントン・バイオケミカル・カンパニー製)及び0.2%(w/v)ディスパーゼ(合同酒精製)処理して調製した。骨髓細胞は、常法に従い成熟したマウスより調製した。48ウエル・プレートの1ウエル当たり、10%(v/v)ウシ胎児血清を補足した α -MEM培地(以下、この実験例4-2を通して、単に「培地」という。)0.4mlで、 2×10^4 個の初代骨芽細胞と 5×10^5 個の骨髓細胞を、5%CO₂インキュベーター内で37℃で7日間共培養した。これを陰性対照とした。一方、別のウエルでは、 1α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃(和光純薬製)及びプロスタグラランジンE₂(アメリ

力国、シグマ製)を、濃度がそれぞれ $10^{-8}M$ 及び $10^{-7}M$ となるように添加した培地を用いた以外は全て陰性対照と同一の方法で培養した。これを陽性対照とした。また、さらに別のウエルでは、陽性対照と同濃度の 1α , 25-ジヒドロキシビタミンD₃及びプロスタグラジンE₂とともに実験例6の方法で調製したIL-18を0.01乃至10ng/mlのいずれかの濃度となるように添加した培地を用いた以外は全て陽性対照と同一の方法で培養した。いずれの場合も培養3日目に、それぞれのウエルでそれまでに用いていたのと同一組成の新鮮な培地と交換した。6日間培養した後の細胞を、エヌ・ウダガワら、『ジャーナル・オブ・エキスペリメンタル・メディシン』、第182巻(1995年)、1461乃至1468頁に記載の方法に従って、固定し、TRAP活性に基づき染色し、1ウエルあたり染色された細胞(以下、「TRAP陽性細胞」という。)の数を数えた。この実験例4-2を通して、全て同一の培養系を4ウエルずつ設け、1ウエル当たりのTRAP陽性細胞数の平均値を求めた。結果を表2に示す。

【0042】

【表2】

IL-18濃度 (ng/ml)	破骨細胞形成因子*1	1ウエル当たりの TRAP陽性細胞数*2
0	-	2
0	+	110
0.01	+	114
0.1	+	111
0.5	+	106
1	+	63
2	+	29
4	+	12
8	+	2
10	+	2

註) *1: +は1α, 25-ヒドロキシビタミンD3及びプロスタグランジンE2を、それぞれ濃度 10^{-8} M及び 10^{-7} Mとなるように添加したことを表し、-はいずれも添加しなかったことを表す。

*2: 同一条件で4ウエルで培養を行った結果の平均値を示した。

【0043】

表2に示すように、陰性対照ではTRAP陽性細胞の形成はほとんど認められなかったのに対し、陽性対照ではTRAP陽性細胞の形成は顕著であった。一方、陽性対照にさらにIL-18を添加した系では、その濃度に依存してTRAP陽性細胞の形成が阻害され、IL-18濃度が8ng/ml以上のときその阻害は最大で、TRAP陽性細胞数は陰性対照と同等の値となった。以上のこととは、当該IL-18には確かにイン・ビトロにおけるOCL形成を阻害する作用のあることを示しており、さらに当該IL-18が破骨細胞形成を阻害することをも強く示唆している。

【0044】

【実験例7-2(b)】

先にも述べたように、この実験例7-2を通して用いられる共培養系において破骨細胞様の細胞の形成を促す因子には種々のものがあると確認されている。そこでこの実験例7-2(b)では、実験例7-2(a)で示された破骨細胞形成に対する当該IL-1₈の阻害作用が、ある種の因子に特異的なものか否かを調べた。すなわち、1_α、25-ジヒドロキシビタミンD₃、プロスタグランジンE₂、副甲状腺ホルモン、インターロイキン1又はインターロイキン11のいずれかを、それぞれ濃度10⁻⁸M、10⁻⁷M、200ng/ml、100ng/ml又は20ng/mlとなるように添加した培地を用いた以外は、全て実験例7-2(a)の陰性対照と同一の方法で培養した。これらを陽性対照とした。一方、別のウエルでは、この陽性対照と同濃度のいずれかの因子に加え、さらに実験例6の方法で得たIL-1₈を10ng/mlとなるように添加した培地を用いた以外は全て陽性対照と同一の方法で培養した。培養後実験例7-2(a)と同じくTRAP陽性細胞の数を比較した。結果を表3に示す。

【0045】

【表3】

破骨細胞形成因子*1 (濃度)	I L - 1 8 *2	1 ウエル当たりの T R A P 陽性細胞数*3
D ₃ (10 ⁻⁸ M)	-	9 4
	+	3
P G E ₂ (10 ⁻⁷ M)	-	7 7
	+	3
P T H (200ng/ml)	-	6 3
	+	3
I L - 1 1 (100ng/ml)	-	8 4
	+	3
I L - 1 (20ng/ml)	-	7 1
	+	3

註) *1 : D₃、PGE₂、PTH、IL-11及びIL-1は、1α,25-ヒドロキシビタミンD₃、プロスタグランジンE₂、副甲状腺ホルモン、インターロイキン11及びインターロイキン1を、それぞれ括弧内で示した濃度になるように添加したことを表している。

*2 : +はIL-18を濃度10ng/mlとなるように添加したことを、-はIL-18を添加しなかったことを表している。

*3 : 同一条件で4ウエルで培養を行った結果の平均値を示した。

【0046】

表3に示すように、いずれも陽性対照では顕著なT R A P 陽性細胞の形成を認めた。これに対し、陽性対照にI L - 1 8 を添加した場合にはいずれもT R A P 陽性細胞の形成はほぼ完全に阻害された。このことは、当該I L - 1 8 が破骨細

胞形成の要因によらず、広く一般的に破骨細胞の形成を阻害する作用を有することを強く示唆している。

【0047】

【実験例 7-2 (c)】

次に、以上実験例 7-2 (a) 及び実験例 7-2 (b) により確認された、当該 IL-1 β による破骨細胞の形成の阻害が、当該 IL-1 β により產生の誘導された GM-CSF の作用によるものか否かを調べた。陰性対照及び陽性対照は、それぞれ実験例 7-2 (a) で示したのと同一の系を用いた。別のウェルでは、この陽性対照と同じ濃度の 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン D₃ 及びプロスタグランジン E₂ を添加するとともに、さらに (i) 抗マウス GM-CSF ポリクローナル抗体（アメリカ国、アール・アンド・ディー・システムズ製）を濃度 10 μ g/ml となるように添加するか、(ii) 実験例 6 の方法で得た IL-1 β を濃度 10 ng/ml となるよう添加するか、(iii) i に加えさらに抗マウス GM-CSF ポリクローナル抗体を濃度 10 μ g/ml となるよう添加するか、(iv) マウス GM-CSF（アメリカ国、アール・アンド・ディー・システムズ製）を濃度 0.1 ng/ml となるように添加するか、又は (v) i v に加えさらに抗マウス GM-CSF ポリクローナル抗体を濃度 10 μ g/ml となるように添加した培地のいずれかを用いたこと以外は、全て陽性対照と同じ方法で培養した。培養後実験例 7-2 (a) と同じく TRAP 陽性細胞の数を比較した。結果を表 4 に示す。なお、表 4 中に示した i 乃至 v の符号は、ここで説明した対照系以外の培養系の符号と一致している。

【0048】

【表4】

培養系 ^{*1}	破骨細胞 形成因子 ^{*2}	IL-18 ^{*3}	GM- CSF ^{*4}	抗GM- CSF抗体 ^{*5}	1ウエル当たりの TRAP陽性細胞数 ^{*6}
N	-	-	-	-	3
P	+	-	-	-	1 2 2
i	+	-	-	+	1 1 2
ii	+	+	-	-	3
iii	+	+	-	+	1 1 1
iv	+	-	+	-	4
v	+	-	+	+	1 0 6

註)

*1 : Nは陰性対照を、Pは陽性対照を、それぞれ表す。i乃至vは、5種類の培養系の符号と同一。

*2 : +は1α, 25-ヒドロキシビタミンD₃及びプロスタグランдинE₂を、それ
ぞれ濃度10⁻⁸M及び10⁻⁷Mとなるように添加したことを表し、-はいずれも添加しなか
ったことを表している。*3 : +はIL-18を濃度10ng/mlとなるように添加したことを表し、-はIL-18を添
加しなかったことを表している。*4 : +はGM-CSFを濃度0.1ng/mlとなるように添加したことを表し、-はGM-CSF
を添加しなかったことを表している。*5 : +は抗GM-CSFポリクローナル抗体を濃度10μg/mlとなるように添加したことを表
し、-は抗GM-CSFポリクローナル抗体を添加しなかったことを表している。

*6 : 同一条件で4ウエルで培養を行った結果の平均値を示した。

【0049】

表4に示すように、TRAP陽性細胞の形成はIL-18によりほぼ完全に阻害された（培養系ii）が、この阻害は、抗マウスGM-CSFポリクローナル抗体の添加によりほぼ完全に解除された（培養系iii）。一方マウスGM-CSFにも、IL-18と同様にTRAP陽性細胞の形成を阻害する作用が認めら

れた（培養系 i v）が、この阻害は、抗マウス GM-CSF ポリクローナル抗体の添加によりほぼ完全に解除された（培養系 v）。また、当該抗体単独では TR A P 陽性細胞の形成には何の影響も与えなかった（培養系 i）。以上の結果は、当該 IL-18 の破骨細胞形成に対する阻害は、主として、当該 IL-18 により誘導され產生した GM-CSF の作用によるものであることを強く示唆している。

【0050】

【実験例 8】

<急性毒性試験>

常法にしたがって、8週齢のマウスに実験例 1 乃至 6 の方法で得た当該 IL-18 のいずれかをそれぞれ別個に経皮、経口又は腹腔内に注射投与した。その結果、これら当該 IL-18 の LD₅₀ は、いずれの投与経路によっても約 1 mg / kg マウス体重以上であった。このことは当該 IL-18 がヒトを始めとする温血動物への投与を前提とする医薬品に配合して安全であることを裏付けている。

【0051】

また、当該 IL-18 により誘導され產生される GM-CSF は、日経 BP 社発行、『日経バイオ年鑑 96』（1995年）、498 乃至 499 頁に記載されているように、日本国内ではまだ臨床応用されるに至ってはいないものの、米国や欧州では既に臨床応用されており、その安全性については問題がないといえる。以上のこととは、この発明の破骨細胞形成阻害剤が重篤な副作用を惹起することなくヒトを始めとする温血動物に長期連用でき、破骨細胞の形成及び／又は機能が関与する疾患の治療・予防に効果を發揮することを示している。

【0052】

以下に実施例を示し、この発明の破骨細胞形成阻害剤を説明する。

【0053】

【実施例 1】

<液剤>

安定剤として 1% (w/v) ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例 1

乃至 6 の方法により得たいずれかの当該 I L - 1 8 を 2 m g / m l になるように溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌して液剤を得た。

【0054】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての注射剤、点眼剤、点鼻剤として有用である。

【0055】

【実施例 2】

〈乾燥剤〉

安定剤として 1 % (w/v) 精製ゼラチンを含む生理食塩水 100 m l に実験例 1 乃至 6 の方法により得たいずれかの当該 I L - 1 8 を 50 m g 溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に 1 m l ずつ分注し、凍結乾燥後、密栓した。

【0056】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての乾燥注射剤として有用である。

【0057】

【実施例 3】

〈乾燥剤〉

安定剤として 1 % (w/v) トレハロースを含む生理食塩水 100 m l に実験例 1 乃至 6 の方法により得たいずれかの当該 I L - 1 8 を 50 m g 溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に 1 m l ずつ分注し、凍結乾燥後、密栓した。

【0058】

本品はいずれも安定性に優れ、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての乾燥注射剤として有用である。

【0059】

【実施例4】

〈軟膏剤〉

滅菌蒸留水に和光純薬工業製カルボキシビニルポリマー『ハイビスワコー104』及び高純度トレハロースをそれぞれ濃度1.4% (w/w) 及び2.0% (w/w) になるように溶解し、実験例1乃至6の方法により得たいずれかの当該IL-18を均一に混合後、pH 7.2に調製して、1g当たり当該IL-18を約1mg含むペースト状物を得た。

【0060】

本品はいずれも延展性と安定性に優れ、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての軟膏剤として有用である。

【0061】

【実施例5】

〈錠剤〉

林原製無水結晶α-マルトース粉末『ファイントース』に実験例1乃至6の方法により得たいずれかの当該IL-18と細胞賦活剤としてのルミンを均一に混合し、得られる混合物を常法により打錠して製品1錠（約200mg）当たり当該IL-18及びルミンをそれぞれ約2mg含む錠剤を得た。

【0062】

本品はいずれも摂取性、安定性に優れ、しかも細胞賦活作用をも有し、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症等を治療・予防するための破骨細胞関連疾患剤としての錠剤として有用である。

【0063】

【発明の効果】

以上説明したように、この発明の破骨細胞形成阻害剤は、イン・ビトロ、イン・ビボを問わず、破骨細胞の形成を顕著に阻害するので、細胞培養用の培地成分として有用であり、また、骨吸収調整剤や、高カルシウム血症、破骨細胞腫及び骨粗鬆症を始めとする破骨細胞関連疾患を治療・予防するための疾患剤としても

効果を発揮する。

【0064】

この発明は、斯くも顯著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明といえる。

【0065】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

A s n A s p G l n V a l L e u P h e

1 5

【0066】

配列番号：2

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

P h e G l u A s p M e t T h r A s p

1 5

【0067】

配列番号：3

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys

1 5

【0068】

配列番号：4

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Met Tyr Lys Asp Ser

1 5

【0069】

配列番号：5

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメントの種類：中間部フラグメント

配列

Ser Thr Leu Ser Cys

1 5

【0070】

配列番号：6

配列の長さ：157

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn
1															
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Cys	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile
35															
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile
50															
Ser	Val	Lys	Cys	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Glu	Asn	Lys	Ile
65															
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys
85															
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys
100															
Met	Gln	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ala	Cys	Glu
115															
Lys	Glu	Arg	Asp	Leu	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu
130															
Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Met	Phe	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Asp			
145															
【0071】															

配列番号：7

配列の長さ：157

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Asn	Phe	Gly	Arg	Leu	His	Cys	Thr	Thr	Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ile	Asn		
1									10						15		
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Val	Asp	Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Phe	Glu	Asp	Met		
														20	25	30	
Thr	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gln	Thr	Arg	Leu	Ile	Ile		
														35	40	45	
Tyr	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Gly	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Ser		
														50	55	60	
Val	Lys	Asp	Ser	Lys	Met	Ser	Thr	Leu	Ser	Cys	Lys	Asn	Lys	Ile	Ile		
														65	70	75	80
Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Asp	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Gln	Ser		
														85	90		95
Asp	Leu	Ile	Phe	Phe	Gln	Lys	Arg	Val	Pro	Gly	His	Asn	Lys	Met	Glu		
														100	105		110
Phe	Glu	Ser	Ser	Leu	Tyr	Glu	Gly	His	Phe	Leu	Ala	Cys	Gln	Lys	Glu		
														115	120		125
Asp	Asp	Ala	Phe	Lys	Leu	Ile	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asp			
														130	135		140
Lys	Ser	Val	Met	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	His	Gln	Ser					
														145	150		155

【0072】

配列番号：8

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

組織：肝臓

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..471

特徴を決定した方法：E

配列

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT	48
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	96
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp	
20 25 30	
ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile	
35 40 45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	192
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile	
50 55 60	
TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys	
85 90 95	
AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG	336
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys	
100 105 110	

ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA	384	
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu		
115	120	125
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG	432	
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu		
130	135	140
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC	471	
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp		
145	150	155

【0073】

配列番号：9

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Met Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser

1 5 10

【0074】

配列番号：10

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：C末端フラグメント

配列

Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

1 5 10

【0075】

配列番号：11

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg

1 5 10

【0076】

配列番号：12

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg

1 5 10

【0077】

配列番号：13

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys

1 5 10 15

【0078】

配列番号：14

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..471

特徴を決定した方法：S

配列

TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT	48
Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn	
1 5 10 15	
GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT	96
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp	
20 25 30	
ATG ACT GAT TCT GAC TCT AGA GAT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT	144
Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile	
35 40 45	
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC	192
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile	
50 55 60	
TCT GTG AAG TCT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC GCT GAG AAC AAA ATT	240
Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Ala Glu Asn Lys Ile	
65 70 75 80	
ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA	288

Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys			
85	90	95	
AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG			336
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys			
100	105	110	
ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA			384
Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu			
115	120	125	
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG			432
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu			
130	135	140	
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC			471
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp			
145	150	155	

【0079】

配列番号：15

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser		
1	5	10

【0080】

配列番号：16

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の特徴

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：1..471

特徴を決定した方法：S

配列

TAC	TTT	GGC	AAG	CTT	GAA	TCT	AAA	TTA	TCA	GTC	ATA	AGA	AAT	TTG	AAT	48
Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser	Val	Ile	Arg	Asn	Leu	Asn	
1	5							10						15		
GAC	CAA	GTT	CTC	TTC	ATT	GAC	CAA	GGA	AAT	CGG	CCT	CTA	TTT	GAA	GAT	96
Asp	Gln	Val	Leu	Phe	Ile	Asp	Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Leu	Phe	Glu	Asp	
	20					25						30				
ATG	ACT	GAT	TCT	GAC	TCT	AGA	GAT	AAT	GCA	CCC	CGG	ACC	ATA	TTT	ATT	144
Met	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Ile	
	35					40						45				
ATA	AGT	ATG	TAT	AAA	GAT	AGC	CAG	CCT	AGA	GGT	ATG	GCT	GTA	ACT	ATC	192
Ile	Ser	Met	Tyr	Lys	Asp	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Met	Ala	Val	Thr	Ile	
	50					55				60						
TCT	GTG	AAG	TCT	GAG	AAA	ATT	TCA	ACT	CTC	TCC	GCT	GAG	AAC	AAA	ATT	240
Ser	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Lys	Ile	
	65					70				75			80			
ATT	TCC	TTT	AAG	GAA	ATG	AAT	CCT	CCT	GAT	AAC	ATC	AAG	GAT	ACA	AAA	288
Ile	Ser	Phe	Lys	Glu	Met	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	
	85					90						95				
AGT	GAC	ATC	ATA	TTC	TTT	CAG	AGA	AGT	GTC	CCA	GGA	CAT	GAT	AAT	AAG	336
Ser	Asp	Ile	Ile	Phe	Phe	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Gly	His	Asp	Asn	Lys	
	100					105						110				
ATG	CAA	TTT	GAA	TCT	TCA	TAC	GAA	GGA	TAC	TTT	CTA	GCT	TCT	GAA	384	

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Ser Glu			
115	120	125	
AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG			432
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu			
130	135	140	
GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA GAC			471
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp			
145	150	155	

【0081】

配列番号：17

配列の長さ：11464

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列の特徴

起源

生物名：ヒト

株名：胎盤

配列の特徴

特徴を表す記号：5' UTR

存在位置：1..3

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：leader peptide

存在位置：4..82

特徴を決定した方法：S

特徴を表す記号：intron

存在位置：83..1453

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号 : leader peptide

存在位置 : 1454..1465

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 1466..4848

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : leader peptide

存在位置 : 4849..4865

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 4866..4983

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 4984..6317

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 6318..6451

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 6452..11224

特徴を決定した方法 : E

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 11225..11443

特徴を決定した方法 : S

特徴を表す記号 : 3' UTR

存在位置 : 11444..11464

特徴を決定した方法 : E

配列

AAG ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA 48

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala

-35 -30 -25

ATG AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA G GTAAGG CTAATGCCAT 98

Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala

-20 -15 -10

AGAACAAATA CCAGGTTCAAG ATAAATCTAT TCAATTAGAA AAGATGTTGT GAGGTGAACT 158

ATTAAGTGAC TCTTGTGTC ACCAAATTTC ACTGTAATAT TAATGGCTCT TAAAAAAATA 218

GTGGACCTCT AGAAATTAAC CACAACATGT CCAAGGTCTC AGCACCTTGT CACACCACGT 278

GTCCTGGCAC TTTAATCAGC AGTAGCTCAC TCTCCAGTTG GCAGTAAGTG CACATCATGA 338

AAATCCCAGT TTTCATGGGA AAATCCCAGT TTTCATTGGA TTTCCATGGG AAAAATCCCA 398

GTACAAAACT GGGTGCATTC AGGAAATACA ATTTCCAAA GCAAATTGGC AAATTATGTA 458

AGAGATTCTC TAAATTAGA GTTCCGTGAA TTACACCATT TTATGAAAT ATGTTTGACA 518

AGTAAAAATT GATTCTTTT TTTTTTTCT GTTGCCAGG CTGGAGTGCA GTGGCACAAT 578

CTCTGCTCAC TGCAACCTCC ACCTCCTGGG TTCAAGCAAT TCTCCTGCCT CAGCCTCTG 638

AGTAGCTGGG ACTACAGGTG CATCCCGCCA TGCCTGGCTA ATTTTGGGT ATTTTACTA 698

GAGACAGGGT TTTGGCATGT TGTCCAGGCT GGTCTTGGAC TCCTGATCTC AGATGATCCT 758

CCTGGCTCGG GCTCCAAAG TGCTGGATT ACAGGCATGA ACCACCACAC ATGGCCTAAA 818

AATTGATTCT TATGATTAAT CTCCTGTGAA CAATTGGCT TCATTTGAAA GTTGCCTTC 878

ATTGAAACC TTCATTAAA AGCCTGAGCA ACAAAAGTGAG ACCCCATCTC TACAAAAAAC 938

TGCAAAATAT CCTGTGGACA CCTCCTACCT TCTGTGGAGG CTGAAGCAGG AGGATCACTT 998

GAGCCTAGGA ATTTGAGCCT GCAGTGAGCT ATGATCCCAC CCCTACACTC CAGCCTGCAT 1058

GACAGTAGAC CCTGACACAC ACACACAAAA AAAAACCTTC ATAAAAAATT ATTGTTGAC 1118

TTTCTTAGG TGACTTTCCG TTTAAGCAAT AAATTAAAAA GTAAAATCTC TAATTTAGA 1178

AAATTATTT TTAGTTACAT ATTGAAATT TTAAACCTA GGTTAAGTT TTATGTCTAA 1238

ATTACCTGAG AACACACTAA GTCTGATAAG CTTCATTTA TGGGCCTTT GGATGATTAT 1298

ATAATATTCT GATGAAAGCC AAGACAGACC CTTAAACCAT AAAAATAGGA GTTCGAGAAA 1358

GAGGAGTAGC AAAAGTAAAAA GCTAGAATGA GATTGAATTG TGAGTCGAAA TACAAAATT 1418

TACATATTCT GTTTCTCTCT TTTTCCCCCT CTTAG CT GAA GAT GAT G GTAAA 1470

Ala Glu Asp Asp Glu

-10

GTAGAAATGA	ATTTATTTTT	CTTGCAAAAC	TAAGTATCTG	CTTGAGACAC	ATCTATCTCA	1530
CCATTGTCAG	CTGAGGAAAA	AAAAAAATGG	TTCTCATGCT	ACCAATCTGC	CTTCAAAGAA	1590
ATGTGGACTC	AGTAGCACAG	CTTGGAATG	AAGATGATCA	TAAGAGATAAC	AAAGAAGAAC	1650
CTCTAGCAAA	AGATGCTTCT	CTATGCCTTA	AAAAATTCTC	CAGCTCTAG	AATCTACAAA	1710
ATAGACTTTG	CCTGTTCAT	TGGTCCTAAG	ATTAGCATGA	AGCCATGGAT	TCTGTTGTAG	1770
GGGGAGCGTT	GCATAGGAAA	AAGGGATTGA	AGCATTAGAA	TTGTCCAAAA	TCAGTAACAC	1830
CTCCTCTCAG	AAATGCTTG	GGAAGAAGCC	TGGAAGGTTC	CGGGTTGGTG	GTGGGGTGGG	1890
GCAGAAAATT	CTGGAAGTAG	AGGAGATAGG	AATGGGTGGG	GCAAGAAGAC	CACATTAGA	1950
GGCCAAAAGC	TGAAAGAAC	CATGGCATT	ATGATGAATT	CAGGGTAATT	CAGAATGGAA	2010
GTAGAGTAGG	AGTAGGAGAC	TGGTGAGAGG	AGCTAGAGTG	ATAAACAGGG	TGTAGAGCAA	2070
GACGTTCTCT	CACCCCAAGA	TGTGAAATT	GGACTTTATC	TTGGAGATAA	TAGGGTTAAT	2130
TAAGCACAAT	ATGTATTAGC	TAGGGTAAAG	ATTAGTTGT	TGTAACAAAG	ACATCCAAAG	2190
ATACAGTAGC	TGAATAAGAT	AGAGAATT	TCTCTCAAAG	AAAGTCTAAG	TAGGCAGCTC	2250
AGAAGTAGTA	TGGCTGGAAG	CAACCTGATG	ATATTGGAC	CCCCAACCTT	CTTCAGTCTT	2310
GTACCCATCA	TCCCCTAGTT	GTTGATCTCA	CTCACATAGT	TGAAAATCAT	CATACTTCCT	2370
GGGTTCATAT	CCCAGTTATC	AAGAAAGGGT	CAAGAGAAGT	CAGGCTCATT	CCTTCAAAG	2430
ACTCTAATTG	GAAGTTAAC	ACATCAATCC	CCCTCATATT	CCATTGACTA	GAATTAAATC	2490
ACATGGCCAC	ACCAAGTGCA	AGGAAATCTG	GAAAATATAA	TCTTATTCC	AGGTAGCCAT	2550
ATGACTCTT	AAAATTAGA	AATAATATAT	TTTAAATAA	TCATTCTGGC	TTTGGTATAA	2610
AGAATTGATG	GTGTGGGTG	AGGAGGCCAA	AATTAAGGGT	TGAGAGCCTA	TTATTTAGT	2670
TATTACAAGA	AATGATGGTG	TCATGAATTA	AGGTAGACAT	AGGGGAGTGC	TGATGAGGAG	2730
CTGTGAATGG	ATTTTAGAAA	CACTTGAGAG	AATCAATAGG	ACATGATT	GGGTTGGATT	2790
TGGAAAGGAG	AAGAAAGTAG	AAAAGATGAT	GCCTACATT	TTCACTTAGG	CAATTGTAC	2850
CATTCAGTGA	AATAGGGAAC	ACAGGAGGAA	GAGCAGGTT	TGGTGTATAC	AAAGAGGAGG	2910
ATGGATGACG	CATTCGTTT	TGGATCTGAG	ATGTCGTGG	AACGTCTAG	TGGAGATGTC	2970
CACAAACTCT	TCTACATGTG	GTTCTGAGTT	CAGGACACAG	ATTGGGCTG	GAGATAGAGA	3030
TATTGTAGGC	TTATACATAG	AAATGGCATT	TGAATCTATA	GAGATAAAA	GACACATCAG	3090
AGGAAATGTG	TAAAGTGAGA	GAGGAAAAGC	CAAGTACTGT	GCTGGGGGGA	ATACCTACAT	3150

TTAAAGGATG CAGTAGAAAG AAGCTAATAA ACAACAGAGA GCAGACTAAC CAAAAGGGGA	3210
GAAGAAAAAC CAAGAGAATT CCACCGACTC CCAGGAGAGC ATTTCAAGAT TGAGGGATA	3270
GGTGTGTGT TGAATTTGC AGCCTTGAGA ATCAAGGCC AGAACACAGC TTTTAGATT	3330
AGCAACAAAG AGTTTGGTGA TCTCAGTGAA AGCAGCTTGA TGGTGAATG GAGGCAGAGG	3390
CAGATTGCAA TGAGTGAAC AGTGAATGGG AAGTGAAGAA ATGATACAGA TAATTCTTGC	3450
TAAAAGCTTG GCTGTTAAA GGAGGAGAGA AACAAAGACTA GCTGCAAAGT GAGATTGGGT	3510
TGATGGAGCA GTTTAAATC TCAAAATAA GAGCTTGTG CTTTTTGAT TATGAAAATA	3570
ATGTGTTAAT TGTAACATAAT TGAGGCAATG AAAAAAGATA ATAATATGAA AGATAAAAAT	3630
ATAAAAACCA CCCAGAAATA ATGATAGCTA CCATTTGAT ACAATATTTC TACACTCCTT	3690
TCTATGTATA TATACAGACA CAGAAATGCT TATATTTTA TTAAAAGGGA TTGTACTATA	3750
CCTAAGCTGC TTTTCTAGT TAGTGATATA TATGGACATC TCTCCATGGC AACGAGTAAT	3810
TGCAGTTATA TTAAGTCAT GATATTCAC AATAAGGGCA TATCTTGCC CTTTTTATT	3870
AATCAATTCT TAATTGGTGA ATGTTGTTT CCAGTTGTT GTTGTATT ACAATGTTCC	3930
CATAAGCATT CCTGTACACC AATGTCACA CATTGTCTG ATTTTTCTT CAGGATAAAA	3990
CCCAGGAGGT AGAATTGCTG GGTTGATAGA AGAGAAAGGA TGATTGCCAA ATTAAAGCTT	4050
CACTAGAGGG TACATGCCGA GCACAAATGG GATCAGCCCT AGATACCAGA AATGGCACTT	4110
TCTCATTCC CCTTGGGACA AAAGGGAGAG AGGCAATAAC TGTGCTGCCA GAGTTAAATT	4170
TGTACGTGGA GTAGCAGGAA ATCATTGCT GAAAATGAAA ACAGAGATGA TGGTGTAGAG	4230
GTCCTGAAGA GAGCAAAGAA AATTGAAAT TGCCTGCTATC AGCTATGGAA GAGAGTGCTG	4290
AACTGGAAAA CAAAAGAAGT ATTGACAATT GGTATGCTTG TAATGGCACC GATTTGAACG	4350
CTTGTGCCAT TGTTCACCAAG CAGCACTCAG CAGCCAAGTT TGGAGTTTG TAGCAGAAAG	4410
ACAAATAAGT TAGGGATTAA ATATCCTGGC CAAATGGTAG ACAAAATGAA CTCTGAGATC	4470
CAGCTGCACA GGGAAAGGAAG GGAAGACGGG AAGAGGTTAG ATAGGAAATA CAAGAGTCAG	4530
GAGACTGGAA GATGTTGTGA TATTAAAGAA CACATAGAGT TGGAGTAAAA GTGTAAGAAA	4590
ACTAGAAGGG TAAGAGACCG GTCAGAAAGT AGGCTATTG AAGTTAACAC TTCAGAGGCA	4650
GAGTAGTTCT GAATGGTAAC AAGAAATTGA GTGTGCCTTT GAGAGTAGGT TAAAAAAACAA	4710
TAGGCAACTT TATTGTAGCT ACTTCTGGAA CAGAAGATTG TCATTAATAG TTTTAGAAAA	4770
CTAAAATATA TAGCATACTT ATTTGTCAAT TAACAAAGAA ACTATGTATT TTTAAATGAG	4830
ATTTAATGTT TATTGTAG AA AAC CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT	4880

Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu		
-5	1	5
GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC		4928
Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe		
10	15	20
ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC		4976
Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp		
25	30	35
TGT AGA G GTATTTTT TTAATTGCA AACATAGAAA TGACTAGCTA CTTCTTCCC		5032
Cys Arg Asp		
40		
TTCTGTTTA CTGCTTACAT TGTTCCGTGC TAGTCCAAT CCTCAGATGA AAAGTCACAG		5092
GAGTGACAAT AATTCACCT ACAGGAAACT TTATAAGGCA TCCACGTTT TTAGTTGGGG		5152
TAAAAAATTG GATACAATAA GACATTGCTA GGGGTCATGC CTCTCTGAGC CTGCCTTGA		5212
ATCACCAATC CCTTTATTGT GATTGCATTA ACTGTTAAA ACCTCTATAG TTGGATGCTT		5272
AATCCCTGCT TGTTACAGCT GAAAATGCTG ATAGTTACC AGGTGTGGTG GCATCTATCT		5332
GTAATCCTAG CTACTTGGGA GGCTCAAGCA GGAGGATTGC TTGAGGCCAG GACTTGAGG		5392
CTGTAGTACA CTGTGATCGT ACCTGTGAAT AGCCACTGCA CTCCAGCCTG GGTGATATAAC		5452
AGACCTTGTG TCTAAAATTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAC CTTAGGAAAG GAAATTGATC		5512
AAGTCTACTG TGCCTTCAA AACATGAATT CCAAATATCA AAGTTAGGCT GAGTTGAAGC		5572
AGTGAATGTG CATTCTTAA AAATACTGAA TACTTACCTT AACATATATT TAAATATT		5632
TATTTAGCAT TTAAAAGTTA AAAACAATCT TTTAGAATT ATATCTTAA AATACTCAA		5692
AAAGTTGCAG CGTGTGTGTT GTAATACACA TTAAACTGTG GGGTTGTTG TTTGTTGAG		5752
ATGCAGTTTC ACTCTGTCAC CCAGGCTGAA GTGCAGTGCA GTGCAGTGGT GTGATCTCGG		5812
CTCACTACAA CCTCCACCTC CCACGTTCAA GCGATTCTCA TGCCTCAGTC TCCCGAGTAG		5872
GTGGGATTAC AGGCATGCAC CACTTACACC CGGCTAATT TTGTATTTT AGTAGAGCTG		5932
GGGTTTCAAC ATGTTGCCA GGCTGGTCTC AAACCCCTAA CCTCAAGTGA TCTGCCTGCC		5992
TCAGCCTCCC AAACAAACAA ACAACCCAC AGTTAACAT GTGTTACAAC ACACATGCTG		6052
CAACTTTAT GAGTATTTA ATGATATAGA TTATAAAAGG TTGTTTTAA CTTTAAATG		6112

CTGGGATTAC	AGGCATGAGC	CACTGTGCCA	GGCCTGA	ACT GTTTAA	AAATGTCTGA	6172
CCAGCTGTAC	ATAGTCTCCT	GCAGACTGGC	CAAGTCTCAA	AGTGGAAACA	GGTGTATTAA	6232
GGACTATCCT	TTGGTTAAAT	TTCCGCAAAT	GTTCCGTG	AAGAATTCTT	CTAACTAGAG	6292
TTCTCATTTA	TTATATTTAT	TTCAG	AT AAT GCA CCC CGG ACC ATA TTT ATT			6343
Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile						
	40		45			
ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG GCT GTA ACT ATC						6391
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile						
50	55		60			
TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA ACT CTC TCC TGT GAG AAC AAA ATT						6439
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile						
65	70	75		80		
ATT TCC TTT AAG GTAAG ACTGAGCCTT ACTTTGTTT CAATCATGTT AATATAATCA						6496
Ile Ser Phe Lys						
ATATAATTAG AAATATAACA TTATTCTAA TGTTAATATA AGTAATGTA TTAGAAAAACT						6556
CAAATATCCT CAGACCAACC TTTTGCTAG AACAGAAATA ACAAGAACCA GAGAACCAATT						6616
AAAGTGAATA CTTACTAAAA ATTATCAAAC TCTTACCTA TTGTGATAAT GATGGTTTT						6676
CTGAGCCTGT CACAGGGAA GAGGAGATAC AACACTTGTT TTATGACCTG CATCTCCTGA						6736
ACAATCAGTC TTTATACAAA TAATAATGTA GAATACATAT GTGAGTTATA CATTAAAGAA						6796
TAACATGTGA CTTTCCAGAA TGAGTTCTGC TATGAAGAAT GAAGCTAATT ATCCTTCTAT						6856
ATTCTACAC CTTTGTAAAT TATGATAATA TTTTAATCCC TAGTTGTTT GTGCTGATC						6916
CTTAGCCTAA GTCTTAGACA CAAGCTTCAG CTTCCAGTTG ATGTATGTTA TTTTAATGT						6976
TAATCTAATT GAATAAAAGT TATGAGATCA GCTGTAAAAG TAATGCTATA ATTATCTTCA						7036
AGCCAGGTAT AAAGTATTTC TGGCCTCTAC TTTTCTCTA TTATTCTCCA TTATTATTCT						7096
CTATTATTT TCTCTATTTC CTCCATTATT GTTAGATAAA CCACAATTAA CTATAGCTAC						7156
AGACTGAGCC AGTAAGAGTA GCCAGGGATG CTTACAAATT GGCAATGCTT CAGAGGAGAA						7216
TTCCATGTCA TGAAGACTCT TTTGAGTGG AGATTGCCA ATAAATATCC GCTTCATGC						7276
CCACCCAGTC CCCACTGAAA GACAGTTAGG ATATGACCTT AGTGAAGGTA CCAAGGGCA						7336
ACTTGGTAGG GAGAAAAAAG CCACTCTAAA ATATAATCCA AGTAAGAACCA GTGCATATGC						7396

AACAGATACA	GCCCCCAGAC	AAATCCCTCA	GCTATCTCCC	TCCAACCAGA	GTGCCACCCC	7456
TTCAGGTGAC	AATTGGAGT	CCCCATTCTA	GACCTGACAG	GCAGCTTAGT	TATCAAATA	7516
GCATAAGAGG	CCTGGGATGG	AAGGGTAGGG	TGGAAAGGGT	TAAGCATGCT	GTTACTGAAC	7576
AACATAATT	GAAGGGAAGG	AGATGGCAA	GCTCAAGCTA	TGTGGGATAG	AGGAAAAC	7636
AGCTGCAGAG	GCAGATTCA	AAACTGGGAT	AAGTCCGAAC	CTACAGGTGG	ATTCTTGTG	7696
AGGGAGACTG	GTGAAAATGT	TAAGAAGATG	GAAATAATGC	TTGGCACTTA	GTAGGAAC	7756
GGCAAATCCA	TATTGGGGG	AGCCTGAAGT	TTATTCAATT	TTGATGGCCC	TTTAAATAA	7816
AAAGAACATGTG	GCTGGCGTG	GTGGCTACA	CCTGTAATCC	CAGCACTTG	GGAGGCCGAG	7876
GGGGCGGAT	CACCTGAAGT	CAGGAGTTCA	AGACCAGCCT	GACCAACATG	GAGAAACCCC	7936
ATCTCTACTA	AAAATACAAA	ATTAGCTGGG	CGTGGTGGCA	TATGCCTGTA	ATCCCAGCTA	7996
CTCGGGAGGC	TGAGGCAGGA	GAATCTTTG	AACCCGGGAG	GCAGAGGTTG	CGATGAGCCT	8056
AGATCGTGCC	ATTGCACTCC	AGCCTGGCA	ACAAGAGCAA	AACTCGGTCT	CAAAAAAAA	8116
AAAAAAAAG	TGAAATTAAC	CAAAGGCATT	AGCTTAATAA	TTTAATACTG	TTTTAAGTA	8176
GGGCGGGGGG	TGGCTGGAAG	AGATCTGTGT	AAATGAGGGA	ATCTGACATT	TAAGCTTCAT	8236
CAGCATCATA	GCAAATCTGC	TTCTGGAAGG	AACTCAATAA	ATATTAGTTG	GAGGGGGGGA	8296
GAGAGTGAGG	GGTGGACTAG	GACCAGTTT	AGCCCTGTC	TTTAATCCCT	TTTCCTGCCA	8356
CTAATAAGGA	TCTTAGCAGT	GGTTATAAAA	GTGGCCTAGG	TTCTAGATAA	TAAGATAACAA	8416
CAGGCCAGGC	ACAGTGGCTC	ATGCCTATAA	TCCCAGCACT	TTGGGAGGGC	AAGGCGAGTG	8476
TCTCACTTGA	GATCAGGAGT	TCAAGACCAG	CCTGGCCAGC	ATGGCGATAC	TCTGTCTCTA	8536
CTAAAAAAA	TACAAAAATT	AGCCAGGCAT	GGTGGCATGC	ACCTGTAATC	CCAGCTACTC	8596
GTGAGCCTGA	GGCAGAAGAA	TCGCTTGAAA	CCAGGAGGTG	TAGGCTGCAG	TGAGCTGAGA	8656
TCGCACCACT	GCACCTCAGC	CTGGGCGACA	GAATGAGACT	TTGTCTAAA	AAAAGAAAAA	8716
GATACAACAG	GCTACCCCTA	TGTGCTCACC	TTTCACTGTT	GATTACTAGC	TATAAAGTCC	8776
TATAAAGTTC	TTTGGTCAAG	AACCTTGACA	ACACTAAGAG	GGATTGCTT	TGAGAGGTTA	8836
CTGTCAGAGT	CTGTTCTATA	TATATACATA	TACATGTATA	TATGTATCTA	TATCCAGGCT	8896
TGGCCAGGGT	TCCCTCAGAC	TTTCCAGTGC	ACTTGGGAGA	TGTTAGGTCA	ATATCAACTT	8956
TCCCTGGATT	CAGATTCAAC	CCCTTCTGAT	GTAAAAAAA	AAAAAAA	GAAAGAAATC	9016
CCTTCCCCCT	TGGAGCACTC	AAGTTTCACC	AGGTGGGGCT	TTCCAAGTTG	GGGGTTCTCC	9076
AAGGTCAATTG	GGATTGCTTT	CACATCCATT	TGCTATGTAC	CTTCCCTATG	ATGGCTGGGA	9136

GTGGTCAACA TCAAAACTAG GAAAGCTACT GCCCAAGGAT GTCCTTACCT CTATTCTGAA 9196
 ATGTGCAATA AGTGTGATTA AAGAGATTGC CTGTTCTACC TATCCACACT CTCGCTTCA 9256
 ACTGTAACCT TCTTTTTTC TTTTTTCTT TTTTCTTT TTTTGAAAC GGAGTCTCGC 9316
 TCTGTCGCC AGGCTAGACT GCAGTGGCAC GATCTCAGCT CACTGCAAGC TCTGCCTCCC 9376
 GGGTTCACGC CATTCTCCTG CCTCACCCCTC CCAAGCAGCT GGGACTACAG GCGCCTGCCA 9436
 CCATGCCAG CTAATTTTT GTATTTTAG TAGAGACGGG GTTTCACCGT GTTAGCCAGG 9496
 ATGGTCTCGA TCTCCTGAAC TTGTGATCCG CCCGCCTCAG CCTCCCAAAG TGCTGGATT 9556
 ACAGGCGTGA GCCATCGCAC CCGGCTAAC TGTAACTTTC TATACTGGTT CATCTTCCCC 9616
 TGTAATGTTA CTAGAGCTTT TGAAGTTTG GCTATGGATT ATTTCTCATT TATACATTAG 9676
 ATTCAGATT AGTTCCAAAT TGATGCCAC AGCTTAGGGT CTCTTCCTAA ATTGTATATT 9736
 GTAGACAGCT GCAGAAGTGG GTGCCAATAG GGGAACTAGT TTATACTTTC ATCAACTTAG 9796
 GACCCACACT TGTTGATAAA GAACAAAGGT CAAGAGTTAT GACTACTGAT TCCACAACTG 9856
 ATTGAGAAGT TGGAGATAAC CCCGTGACCT CTGCCATCCA GAGTCTTCA GGCATCTTG 9916
 AAGGATGAAG AAATGCTATT TTAATTTGG AGGTTCTCT ATCAGTGCTT AGGATCATGG 9976
 GAATCTGTGC TGCCATGAGG CCAAAATTAA GTCCAAAACA TCTACTGGTT CCAGGATTAA 10036
 CATGGAAGAA CCTTAGGTGG TGCCCACATG TTCTGATCCA TCCTGAAAAA TAGACATGCT 10096
 GCACTAACAG GAAAAGTGA GGCAGCACTA CCAGTTGGAT AACCTGCAAG ATTATAGTT 10156
 CAAGTAATCT AACCAATTCT CACAAGGCC TATTCTGTGA CTGAAACATA CAAGAATCTG 10216
 CATTGGCCT TCTAAGGCAG GGCCCAGCCA AGGAGACCAT ATTCAAGGACA GAAATTCAAG 10276
 ACTACTATGG AACTGGAGTG CTTGGCAGGG AAGACAGAGT CAAGGACTGC CAACTGAGCC 10336
 AATACAGCAG GCTTACACAG GAACCCAGGG CCTAGCCCTA CAACAATTAT TGGGTCTATT 10396
 CACTGTAAGT TTTAATTCA GGCTCCACTG AAAGAGTAAG CTAAGATTCC TGGCACTTTC 10456
 TGTCTCTCTC ACAGTTGGCT CAGAAATGAG AACTGGTCAG GCCAGGCATG GTGGCTTACA 10516
 CCTGGAATCC CAGCACTTG GGAGGCCGAA GTGGGAGGGT CACTTGAGGC CAGGAGTTCA 10576
 GGACCAGCTT AGGCAACAAA GTGAGATACC CCCTGACCCC TTCTCTACAA AAATAAATT 10636
 TAAAAAATTAG CCAAATGTGG TGGTGTATAC TTACAGTCCC AGCTACTCAG GAGGCTGAGG 10696
 CAGGGGGATT GCTTGAGCCC AGGAATTCAA GGCTGCAGTG AGCTATGATT TCACCACTGC 10756
 ACTTCTGGCT GGGCAACAGA GCGAGACCC GTCTCAAAGC AAAAAGAAAA AGAAACTAGA 10816
 ACTAGCCTAA GTTTGTGGGA GGAGGTCATC ATCGTCTTTA GCCGTGAATG GTTATTATAG 10876

AGGACAGAAA TTGACATTAG CCCAAAAAGC TTGTGGTCTT TGCTGGAAC CTACTTAATC 10936
 TTGAGCAAAT GTGGACACCA CTCATGGGA GAGGAGAGAA GTAAGCTGTT TGATGTATA 10996
 GGGAAAAC TA GAGGCCTGGA ACTGAATATG CATCCCATGA CAGGGAGAAT AGGAGATTG 11056
 GAGTTAAGAA GGAGAGGAGG TCAGTACTGC TGTTCAGAGA TTTTTTTTAT GTAACCTTG 11116
 AGAACGAAAA CTACTTTGT TCTGTTGGT AATATACTTC AAAACAAACT TCATATATTC 11176
 AAATTGTTCA TGTCTGAAA TAATTAGGT AATGTTTTT CTCTATAG GAA ATG AAT 11233

Glu Met Asn

85

CCT CCT GAT AAC ATC AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG 11281

Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Glu

90

95

100

AGA AGT GTC CCA GGA CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA 11329

Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser

105

110

115

TAC GAA GGA TAC TTT CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA 11377

Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys

120

125

130

135

CTC ATT TTG AAA AAA GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC 11425

Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe

140

145

150

ACT GTT CAA AAC GAA GAC TAGCTATTAA AATTCATGC C 11464

Thr Val Gln Asn Glu Asp

155

【0082】

配列番号：18

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: マウス

組織の種類: 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号: mat peptide

存在位置: 1..471

特徴を決定した方法: S

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT	48
Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn	
1 5 10 15	
GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG	96
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met	
20 25 30	
ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA	144
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile	
35 40 45	
TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT	192
Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser	
50 55 60	
GTG AAG GAT AGT AAA ATG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT	240
Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile	
65 70 75 80	
TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT	288
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser	
85 90 95	
GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG	336
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu	

100	105	110
TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA 384		
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu		
115	120	125
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT 432		
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp		
130	135	140
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT 471		
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser		
145	150	155

【0083】

配列番号：19

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：N末端フラグメント

配列

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr

1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】

組換えDNA pKGFHH2の構造を示す図である。

【図2】

組換えDNA pCSHIGIF/MUT35の構造を示す図である。

【図3】

組換えDNA pCSHIGIF/MUT42の構造を示す図である。

【図4】

組換えDNA pBGHuGFIの構造を示す図である。

【図5】

組換えDNA pKGFMH2の構造を示す図である。

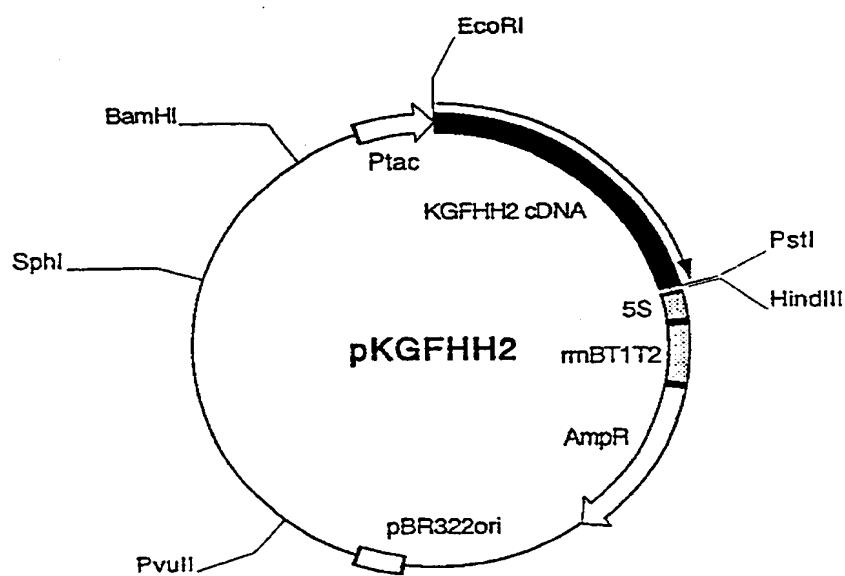
【符号の説明】

KGFHH2 cDNA	当該IL-18をコードするcDNA
IGIF/MUT35	当該IL-18をコードするDNA
IGIF/MUT42	当該IL-18をコードするDNA
HuIGIF	当該IL-18をコードする染色体DNA
KGFHM2 cDNA	当該IL-18をコードするcDNA
5S	5SリボゾームRNA遺伝子
P tac	tacプロモータ
r r n B T 1 T 2	リボゾームRNAオペロンの転写終止領域
AmpR	アンピシリン耐性遺伝子
pBR322ori	大腸菌における複製開始点
CMV	サイトメガロウイルス・プロモーター
IFNss	ヒトインターフェロン- α におけるサブタイプ α 2bのシグナルペプチドをコードする配列

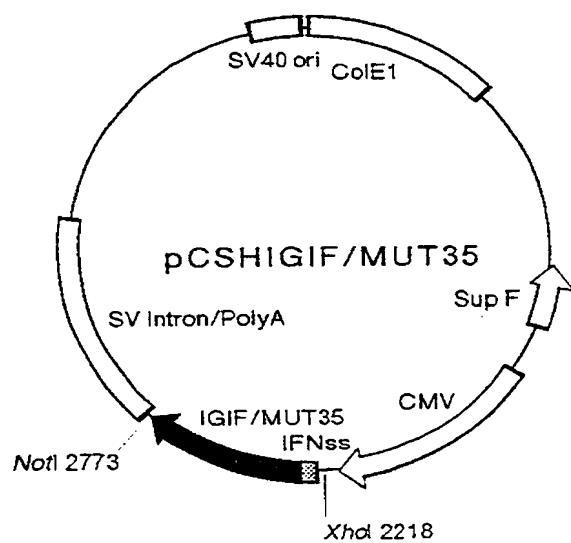
【書類名】

図面

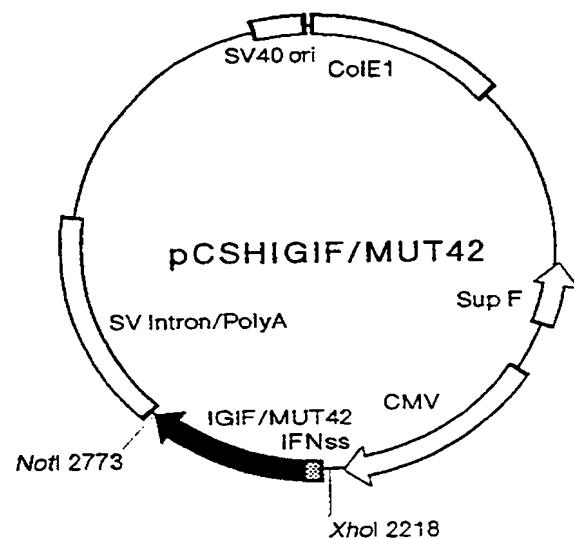
【図 1】



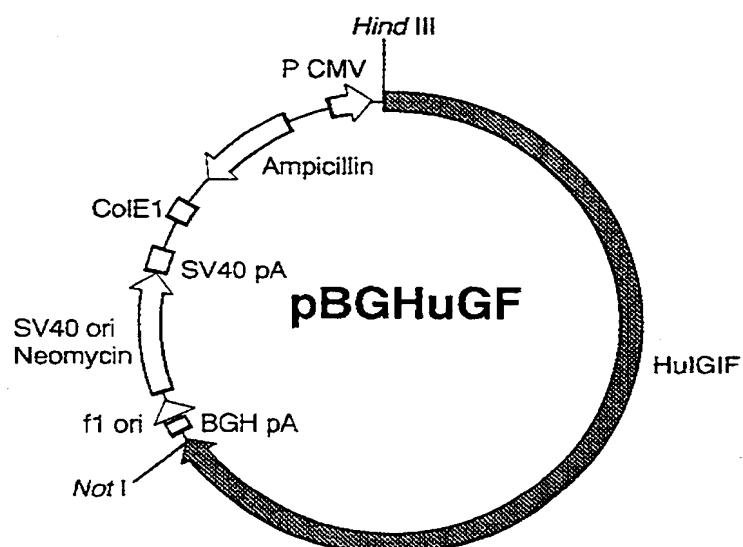
【図 2】



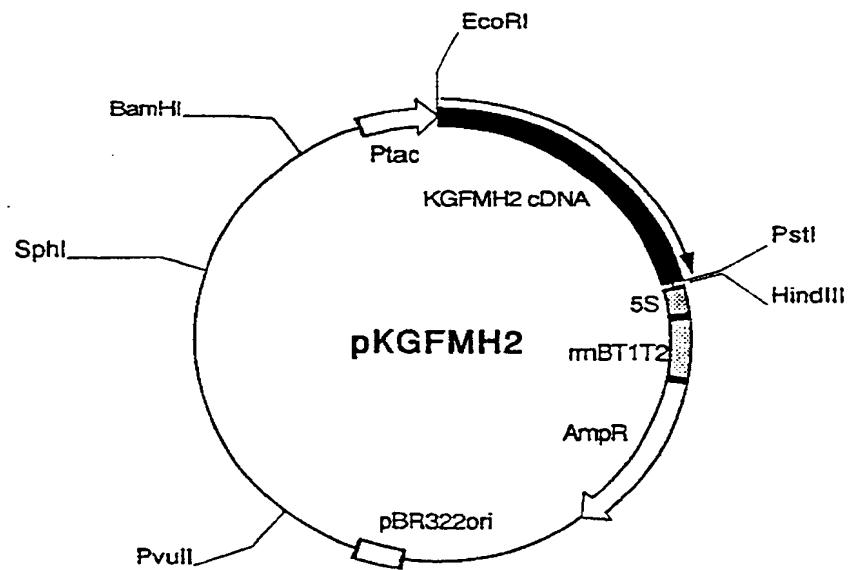
【図3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 効果ある、新規な破骨細胞形成阻害剤を提供する。

【解決手段】 インターロイキン-18又はその機能性誘導体を含んでなる破骨細胞形成阻害剤により解決する。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000155908
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成 9年 7月25日
【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 9年特許願第 55468号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人
【識別番号】 000155908
【郵便番号】 700
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所
【代表者】 林原 健
【発送番号】 018953

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 発明者
【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 オーストラリア連邦、3065、ビクトリア・パレード
・フィッツロイ 41、ザ・ユニバーシティ・オブ・
メルボルン・アンド・セント・ビンセンツ・インスティ
ュート・オブ・メディカル・リサーチ、デパートメ
ント・オブ・メディシン 内

【氏名】 マシュウ・トッド・ギャルスピー

【発明者】

【住所又は居所】 オーストラリア連邦、3065、ビクトリア・パレード
・フィッツロイ 41、ザ・ユニバーシティ・オブ・
メルボルン・アンド・セント・ビンセンツ・インスティ

イテュート・オブ・メディカル・リサーチ、デパートメント
ント・オブ・メディシン 内

【氏名】 ニコル・ジョイ・ホーワッド

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市明原3丁目16番7号

【氏名】 宇田川 信之

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

【氏名】 栗本 雅司

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】 申請人
【識別番号】 000155908
【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

出願人履歴情報

識別番号 [000155908]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

[変更理由] 新規登録

住 所 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
氏 名 株式会社林原生物化学研究所